MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK E
DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann

PHARMAKOKINETIK SUBKUTAN INJIZIERTEN INSULINS, KLINISCH EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR INSULIN-ABSORPTION.

HABILITATIONSSCHRIFT

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Josef Cüppers

1980

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0010

MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK E
DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann

PHARMAKOKINETIK SUBKUTAN INJIZIERTEN INSULINS, KLINISCH EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR INSULIN-ABSORPTION.

HABILITATIONSSCHRIFT

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Josef Cüppers

1980

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A)	Einleitung	4
I.	Zielsetzung der Arbeit	5
II.	Einführung der subkutanen Injektionstherapie in die klinische Medizin	7
III.	Subkutane Absorption und Mikrozirkulation	11
IV.	Einfluss der präparativen Insulinzubereitung auf die biologische Verfügbarkeit von Insulin	20
V.	Methoden zur Bestimmung der subkutanen Insulin-Absorptionsraten	24
B)	Methoden und Experimente	30
I.	Insulin-Absorption aus dem subkutanen Oberschenkeldepot bei Normalpersonen	30
	1. Analytische Methoden	31
	2. Statistische und pharmakokinetische Berechnungen	31
	3. Untersuchungsergebnisse	35
	4. Diskussion	38
C)	Veränderungen der Insulin-Absorption	41
I.	Wechsel der subkutanen Injektionsstelle	41
	1. Versuchsablauf	41
	2. Ergebnisse	42
	3. Diskussion	45
II.	Mischbarkeit von verschiedenen Insulinpräparationen	47
	1. Versuchsablauf	48
	2. Ergebnisse	49
	3. Diskussion	51
III.	Änderungen der Insulin-Absorption durch Temperatur-Effekte und Massage der Injektionsstelle	52
	1. Versuchsablauf	52
	2. Ergebnisse	53
	3. Diskussion	63

UNIV. LEIDEN BIBL.

		Seite
IV.	Veränderungen der Insulin-Absorption durch Muskelarbeit:	66
	1. Versuchsablauf	67
	2. Ergebnisse	69
	3. Diskussion	72
V.	Veränderungen der Insulin-Absorption durch Inhibition der Insulin Degradation in der Subcutis:	74
	1. Versuchsablauf	74
	2. Ergebnisse	75
	3. Diskussion	79
D)	Zusammenfassung	81
E)	Literaturverzeichnis	84
F)	Danksagung	96

A EINLEITUNG

Die Einführung der subkutanen Insulin-Substitutionstherapie bei Patienten mit juvenilem Typ Diabetes mellitus vor ca. 60 Jahren hat für viele Millionen von Patienten lebensrettend gewirkt; trotzdem haben sich im Laufe der Zeit erhebliche Mängel und Schwierigkeiten bei der Durchführung dieser grundsätzlich neuartigen Behandlungsform, der lebenslangen subkutanen Substitution eines Peptidhormons ergeben: Die Feinregulierung des Blutzuckerspiegels und anderer Stoffwechselparameter, wie sie physiologischerweise vor allem durch das Insulin gewährleistet ist, liess sich mit der subkutanen Applikation des Hormons auf Dauer nur in Ausnahmefällen erreichen. Diese Problematik ist von um so grösserer Bedeutung, als aufgrund neuester Erkenntnisse ein Kausalzusammenhang zwischen der Qualität der Stoffwechseleinstellung bei Diabetikern und dem Auftreten von vaskulären Komplikationen gesichert ist (BROWNLEE, 1979; CAHILL, 1976). Aus diesen Gründen ist es nunmehr als absoluter Imperativ der klinischen Diabetologie anzusehen, den juvenilen Diabetiker von Anfang an so zu behandeln, dass das therapeutische Ziel der Normoglykämie möglichst weitgehend und dauerhaft erreicht wird.

Eine fundamentale Schwierigkeit bei der Erzielung einer stabilen Normoglykämie sind die offensichtlichen Schwankungen in der biologischen Wirksamkeit und der Bioverfügbarkeit subkutan injizierten Insulins - ein Phänomen -, dem schon JOSLIN, 1922 bei der Einführung der Insulintherapie Anfang der

zwanziger Jahre grosse Aufmerksamkeit widmete.

Zur Vermeidung derartiger Schwankungen in der Bioverfügbarkeit exogenen Insulins und damit zur Stabilisierung und rationalen Standardisierung der Insulintherapie ist eine systematische Untersuchung der Absorptionskinetik subkutan injizierten Insulins erforderlich. Wegen methodischer Schwierigkeiten bei der Bestimmung von exogenem Insulin im Blut, wurden Studien bislang nur in geringem Umfang durchgeführt, obwohl LAWRENCE 1926 und BÜRGER und KRAMER 1928 bereits vor mehr als 50 Jahren auf diese Problematik aufmerksam gemacht haben.

I Zielsetzung der Arbeit:

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Charakterisierung der Absorption von subkutan injiziertem Insulin geleistet werden. Dabei stehen klinische Probleme im Vordergrund und aus den Ergebnissen lassen sich konkrete Verbesserungsmöglichkeiten für die Therapie des juvenilen Typ Diabetes mellitus ableiten.
Beim insulinpflichtigen Patienten mit Diabetes mellitus kann der Insulinbedarf durch Dosisanpassung individuell variiert werden, die Wirkungsdauer durch Kurz- und Langzeit-Insuline bestimmt werden. Der Wirkungsablauf jeder Insulin-Präparation ist durch Angaben über Wirkungseintritt, Zeitpunkt der Maximalwirkung und der Wirkungsdauer charakterisiert (SCHÖFFLING, 1971; SCHLICHTKRULL, 1975). In

den letzten Jahren hat die Verwendung von Alt-Insulin-Präparaten, meist in Kombination mit langwirkenden Insulinen, in der Behandlung des juvenilen Typ Diabetes mellitus wieder an Bedeutung gewonnen (JÖRGENS, 1979). Jugendlichen Diabetikern wird insbesondere morgens die freie Mischung eines Alt-Insulins mit einem Verzögerungs-Insulin empfohlen. Bei zunehmender Verwendung von Alt-Insulin-Präparaten kommt der Beeinflussung der Absorption des Alt-Insulins aus dem subkutanen Depot zur Stabilisierung der Normoglykämie eine besondere Rolle zu.
Die Darstellung der Absorption von Insulin in die Blutbahn nach subkutaner Injektion ist Ziel der vorgelegten Arbeit. Dabei wird die Bedeutung topographischer, mechanischer, chemischer und thermischer Einflüsse auf den Absorptionsprozess durch folgende experimentelle Untersuchungen geprüft:

1. Absorption von Alt-Insulin aus den subkutanen Depots unterschiedlicher Körperregionen,
2. Mischbarkeit von verschiedenen Insulin-Präparationen und ihr Einfluss auf die Absorption des Alt-Insulins,
3. Einfluss der Umgebungstemperatur und Massage des subkutanen Injektionsortes auf die Insulinabsorption,
4. Bedeutung von Muskelarbeit auf die Absorption von subkutan injiziertem Insulin,
5. Inhibition der Insulin-Degradation in der Subcutis durch einen Proteinase-Inhibitor.

Es wird dazu zunächst ein historischer Überblick über die Einführung dieser Therapieart und die physiko-chemischen Grundlagen der subkutanen In-

jektionstherapie gegeben. Anschliessend werden die eigenen Untersuchungsbefunde dargestellt.

II Einführung der subkutanen Injektionstherapie in die klinische Medizin:

Zur Bedeutung der subkutanen Insulin Applikation schrieb BANTING (1923) im British Medical Journal "Subcutaneous Injection of Insulin is the Method of Choice", da diese Injektionstechnik vom Patienten leicht erlernt und zu Hause selbständig durchgeführt werden kann. Dabei wurde die subkutane Injektionstherapie Mitte des 19. Jahrhunderts als letzte parenterale Behandlungsform - neben der intravasalen und intramuskulären - in die klinische Medizin eingeführt. Die Möglichkeit von der Hautoberfläche durch Permeation Arzneistoffe in den Organismus hineinzubringen, ist eine seit altersher bekannte und bis in die Gegenwart (BRUNNER, 1980) noch angewandte Methode. Während heute die eigentliche Wirksubstanz vorwiegend in Salben oder Gelen eingebunden ist, wurden früher direkt Extrakte von Pflanzen und Tieren auf die Haut aufgetragen.
Dass nicht nur die Hautoberfläche sondern auch das subkutane Gewebe und die Muskulatur in der Lage sind, körperfremde Substanzen an einer Stelle aufzunehmen und im gesamten Organismus zu verteilen, zeigt die oft tödliche Wirkung von Schlangengiften oder die lähmende Wirkung nach Verletzungen durch Curare präparierte Pfeilspitzen. Trotz dieser empirischen Erkenntnisse der universellen Wirkung von lokal applizierten Giften auf den Gesamtorganismus, dauerte

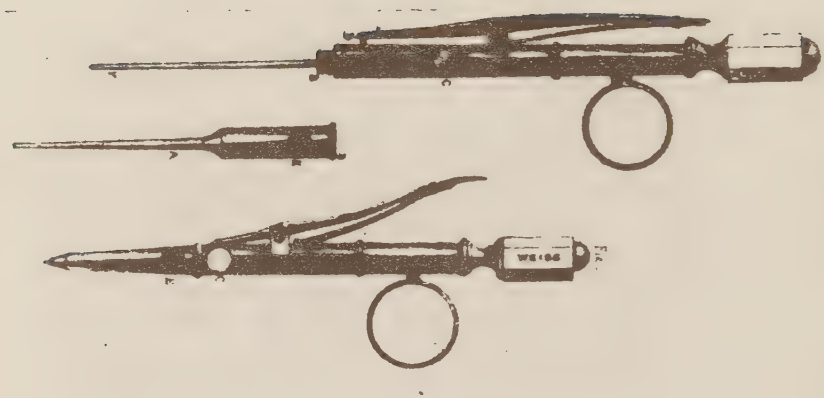

Abb. 1: Von Bruns Implantationsnadeln zur subkutanen Implantation von Pellets (aus: Howard-Jones, 1947)

es bis Mitte des 19. Jahrhundert, bis die ersten methodischen Versuche unternommen wurden, Pharmaka subkutan zu injizieren, nicht um nur eine lokale Wirkung zu erzielen, sondern vielmehr, um die Auswirkungen des Medikamentes auf den Gesamtorganismus zu prüfen.

Die überraschend späte Einführung der subkutanen Injektion von Arzneistoffen in die Therapie begründet man heute damit, dass lange Zeit entsprechende Injektionskanülen und -spritzen mit kleinen Volumina und einer graduierten Scala nicht zur Verfügung standen. So wurden die ersten Versuche von LAFARGUE (1831 - 1861) noch mit Vaccinationslancetten und grosskalibrigen Nadeln, durch die das Medikament als Paste oder Pulver oder als Pellet durch den weitlumigen Stichkanal appliziert wurde, durchgeführt (Abb. 1).

1845 gelingt es RYND erstmalig bei einer Patientin mit einer Trigeminusneuralgie, durch eine Kanüle mit Trocar nach Entfernung des Trocars durch die Hohlnadel entlang der Trigeminusäste eine Morphiumlösung so zu instillieren, dass die Patientin schmerzfrei wurde.

Erst mit den Arbeiten von WOOD und HUNTER aus den Jahren 1855 - 1865 mit einer von FERGUSON entwickelten Glaskolbenspritze beginnt die eigentliche Ära der subkutanen Injektionstherapie (Abb. 2). Dem Londoner Chirurgen HUNTER kommt dabei am ehesten die Ehre zu, als erster die systematische Bedeutung von subkutan applizierten Medikamenten erkannt zu haben. Er injizierte ein Analgetikum nicht direkt in die Schmerzregion, sondern in einigem Abstand davon mit dem gleichen therapeutischen Erfolg. Er zog daraus die Schlussfolgerung, dass die subkutane Injektion von Arzneistoffen in ihrer Wirkung unabhängig ist von der Entfernung bzw. Nähe zum erkrankten Gewebe. Um die Priorität ihrer Ideen entbrannte zwischen HUNTER und WOOD ein jahrelanger Streit, der

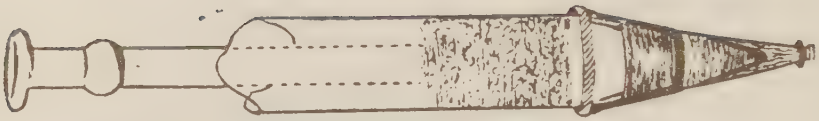

Abb. 2: Glaskolbenspritze wie sie von A. WOOD benutzt wurde (aus: Howard-Jones, 1947)

schliesslich von der LONDON MEDICAL and CHIRURGICAL SOCIETY (1867) mit dem Satz: "That no difference has been observed in the effects of drug subcutaneously injected, whether it be introduced near to, or at a distance from the part affected", beendet wurde.
1856 wurde bereits nach der Methode von WOOD in den USA von einem Dr. FORDYCE die erste Patientin

behandelt und 1887 in Deutschland wurde das Verfahren zuerst von einem Dr. BERTRAND, Badearzt in Schlangenbad, angewandt (HOWARD-JONES, 1947).

Auf die Gefahr des Missbrauchs dieser neuen Injektionsmethode, die zunächst vorwiegend zur Applikation von Analgetika benutzt wurde, wies bereits 1862 LEITER hin. Er schrieb in der WIENER MEDIZINISCHEN WOCHENSCHRIFT: "Die subkutane Injektionsspritze befindet sich jetzt schon nicht mehr in den Händen der meisten Ärzte, sondern selbst in denen der Patienten". NUSSBAUM berichtete 1865 von einem Patienten, der sich wegen einer Neuralgie über 2000 Morphium Injektionen gesetzt hatte.

Die Vorteile dieser neuen Behandlungsform: die leichte Handhabung - auch durch den Patienten, die exakte Dosierung sowie die schnelle und systematische Wirkung konnten erst richtig bemessen werden, als mit der Entdeckung des Insulins die Indikation zur subkutanen Injektionstherapie wesentlich erweitert wurde. Die entscheidende Eigenart der Insulinsubstitution in der Therapie des Diabetes mellitus ist nämlich, dass die oft täglich mehrfach notwendigen Insulininjektionen von den Patienten selbstständig durchgeführt werden müssen.

III Subkutane Absorption und Mikrozirkulation:

Damit ein subkutan appliziertes Medikament seine beabsichtigte Wirkung erbringen kann, muss es zu-

nächst von seinem Injektionsort über die Basalmembran des Kapillarsystems in die Blutbahn aufgenommen und zum Zielorgan transportiert werden. Die meisten Arzneistoffe werden durch passive Transportmechanismen, d.h. durch Diffusion von aussen - milieu exterieur - in die Zirkulation - milieu interieur - aufgenommen. Trotz morphologischer Unterschiede in den einzelnen Zellstrukturen sind die Grenzflächen zwischen dem äusseren und dem inneren Milieu ähnlich aufgebaut (Abb. 3).

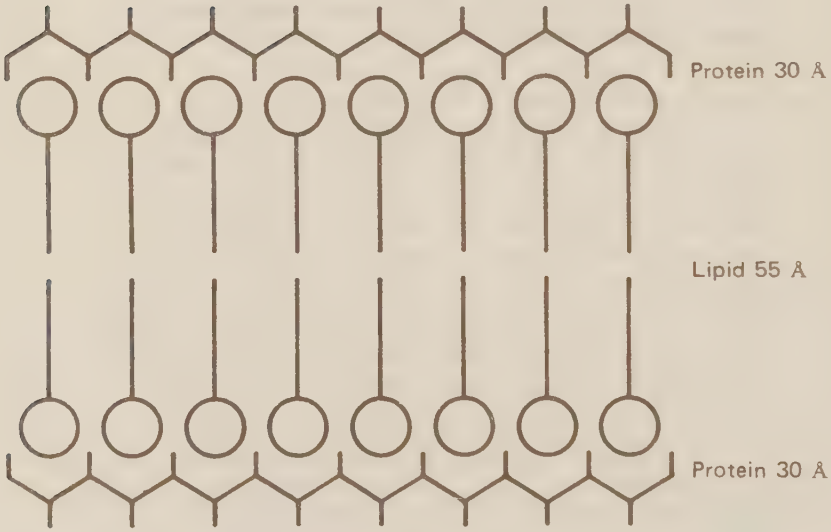

Abb. 3: Schematische Darstellung einer Membranstruktur (aus: Heilmann, 1977)

Die Membranen oder Grenzflächen stellen im biologischen Sinne Barrieren zwischen morphologischen und funktionellen Einheiten dar. Biochemisch besteht ihre Struktur aus Lipid und Proteinmolekülen, die zentrale Schicht zeigt eine bimolekulare Lipidformation. Die hydrophilen Enden sind dem extrazellularen wie dem intrazellularen Raum zugewandt und sind beiderseits von Protein bedeckt. Die Proteinmoleküle sind als offene, parallel gerichtete Fäden angeordnet und durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden (Abb. 3). Diese Struktur ist für die hohe Elastizität und Plastizität der Membran verantwortlich. Die Membransproteine sind nicht nur am Aufbau der Membranstruktur beteiligt, sondern auch an spezifische Transportmechanismen.

Die treibende Kraft, die die transmembrane Bewegung der Substanzen bewirkt, sind überwiegend Konzentrationsunterschiede des Wirkstoffes entlang der Membran. Die für die Diffusion massgebenden Faktoren sind im ersten Fick'schen Gesetz festgelegt:

$$\frac{dn}{dt} = - Dxq \frac{dn}{dx}$$

dn/dt = Nettodiffusion der gelösten Substanz pro Zeiteinheit, q = Querschnitt (Porenfläche), dc/dx = Konzentrationsdifferenz dc über der Diffusionsstrecke dx, D = Diffusionskoeffizient der Substanz, abhängig u.a. vom Molekulargewicht. Das negative Vorzeichen besagt, dass sich die Diffusion von der höheren zur niedrigeren Konzentration vollzieht. Die

jeweilige Diffusionsrate hängt neben der Molekülgrösse im wesentlichen von der Stärke des Konzentrationsgefälles entlang der Membran, von der Membranfläche, die die gelösten Moleküle passieren müssen, und von der Membrandicke ab. Ein wesentlicher Faktor, der die Diffusionsrate entscheidend beeinflusst, ist die Diffusionsstrecke, da sich die Diffusionszeit proportional zum Quadrat der Entfernung verhält.

Nach der subkutanen Injektion eines Arzneistoffes erfolgt die Absorption des Pharmakons aus dem Injektionsdepot über das Kapillarsystem in die Zirkulation (ASHER, 1892; SCHOU, 1961; BINDER, 1969). Der Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blutbahn ist die wichtigste Aufgabe des Kapillarsystems. Die Gewebe des Körpers sind so fein kapillarisiert, dass keine Zelle weiter als 0,12 mm von einer Kapillare entfernt ist (RITSCHEL, 1973). Durch das dichotome Aufzweigungsprinzip des Gefässbaumes von Arterien zu kleinen Arteriolen und Mesarteriolen mit präkapillären Sphinctern (Abb. 4) zur Steuerung der regionalen Durchblutung nimmt der Gesamt-Gefässquerschnitt des Kapillarsystems entscheidend zu. So beträgt die Kapillaroberfläche von 100 g Muskelgewebe bereits 7000 m^2. Die Gesamtlänge des Kapillarsystems wird beim Erwachsenen mit 95000 km angegeben.

Alle Kapillaren sind mit einem Endothel ausgekleidet. Meistens sitzt es einer feinen elastischen Basalmembran - Dicke 600 A - auf, die von einem feinen elastischen Gitterfasergeflecht umgeben sein kann.

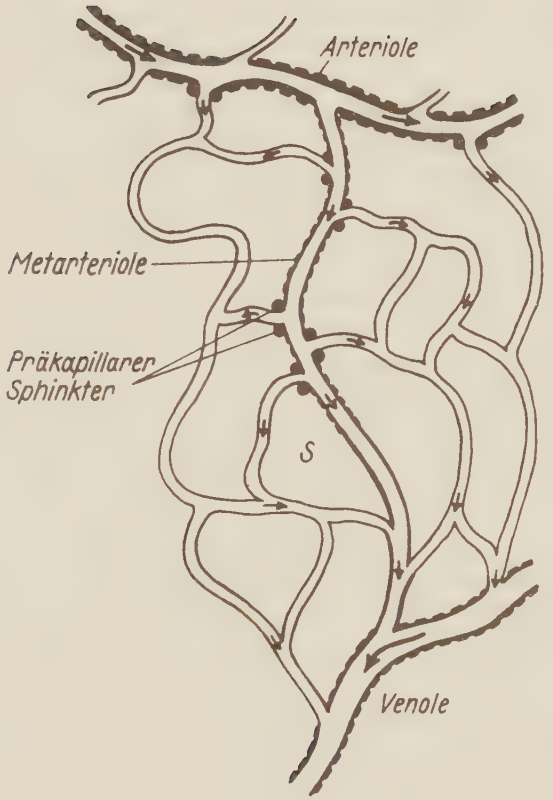

Abb. 4: Regulation der Kapillarströmung
(aus: Landois-Rosemann, 1960)

In vielen Fällen finden sich aussen von der Basalmembran noch Pericyten, deren platter Zelleib mit seinen verzweigten Ausläufern einen Teil des Kapillarrohres überzieht.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ultrastruktur der Kapillarwandung recht manigfaltig sein kann (BUCHER, 1962). Nicht nur das Verhalten des Endothels, sondern auch das der Basalmembran und der Gitterfasern sowie der Pericyten kann je nach Organ und Funktionszustand recht verschieden sein. In der Muskulatur, im Zentralnervensystem und in der Lunge bilden die Endothelzellen einen vollständigen ununterbrochenen Belag. In anderen Fällen ist die Endothelauskleidung dünner und unvollständig, indem relativ weite interzelluläre Lücken, wie z.B. in der Leber, oder in grosser Zahl feine intrazelluläre Poren mit einem Durchmesser von 30 - 400 mμ, wie z.B. in der Niere, vorhanden sind. In anderen Organen wie in den Lebersinusoiden fehlt die Basalmembran. Hier besteht die Möglichkeit eines direkten Stoffaustausches zwischen Blutsystem und der perikapillären Flüssigkeit.

Das Kapillarsystem der Haut entspricht nach den Untersuchungen von BENNET (1959) dem der Muskulatur mit einem geschlossenen Endothelsaum und einer Basalmembran. Im Gegensatz zu den Befunden von PAPPENHEIM (1953), der Poren mit einem Radius von 30 - 40 A und einer Länge von 0,3 μ bei einer Dichte von $1\text{-}2 \times 10^9/cm^2$ Basalmembranfläche nachwies, fand BENNET (1959) in seinen Untersuchungen keinen Hinweis für Poren.

Neben morphologischen Unterschieden ist auch der Grad der Kapillarisierung der einzelnen Organe unterschiedlich. Die Zahl der Kapillaren pro Fläche ist im wesentlichen abhängig vom Energiebedarf. Die Unterschiede in den parenchymatösen Organen wie Niere, Gehirn und Leber ist verhältnismässig gering, gross dagegen in der Muskulatur und der Haut. In der quergestreiften Muskulatur sind im Ruhezustand nur wenige Kapillaren eröffnet, bei Muskelarbeit werden dagegen nicht nur die schon durchströmten erweitert, sondern es kann die Gesamtzahl der durchströmten Kapillaren bis auf das 20-fache ansteigen. Hämodynamisch auffällig und von grosser Bedeutung ist die Abhängigkeit des Strom-Zeit-Volumens von der vierten Potenz des Gefässradius (HAGEN-POISEULLE'sche Gesetz), d.h. eine Erweiterung des Gefässdurchmessers um nur 20% verdoppelt die Durchblutung, Halbierung des Radius reduziert die Durchblutung auf 1/16 des Ausgangswertes (GAUER, 1972).

Die Durchblutung der Haut wird weniger variiert durch Einflüsse der Sauerstoffaufnahme oder des Energiebedarfs als vielmehr durch Temperatureinflüsse. Zur Temperaturregulation weist die Haut als Besonderheit zahlreiche arteriovenöse Anastomosen auf, deren Zahl zur Peripherie der Extremitäten zunimmt. Der mittlere Abstand zwischen zwei Kapillarschlingen wird in der Haut mit 50 - 100 µ angegeben (RYAN, 1973). Topographische Unterschiede in der Kapillarversorgung der Haut konnte RYAN nachweisen. So ist nach seinen Untersuchungen die Kapillarisierung des Gesichtes mit 150 Kapillarschlingen pro mm^2 am grössten und am Oberschenkel mit 29 Kapillaren pro mm^2 am geringsten ausge-

prägt. Die Ruhedurchblutung der Haut wird mit 4 - 6 ml/min/100g Gewebe angegeben (SEJRSEN, 1969). Sie kann sich zur Regulation der Körpertemperatur lokal um fast das 100-fache ändern.

Die Bedeutung des Lymphgefässystems, das in nicht geringerer Zahl wie das Blutkapillarsystem die Gewebe durchsetzt, ist in der Absorption von Medikamenten aus den subkutanen Injektionsdepots als gering anzusehen. So fanden STONE und MILLER (1949) nach subkutaner Injektion von radioaktiv markierter NaCl-Lösung nur 1% der injizierten Substanz im Ductus thoracicus wieder. Als Ursache der verminderten Absorption insbesondere bei Substanzen mit kurzer Halbwertszeit und hoher Absorptionsgeschwindigkeit wird die deutlich geringere Fliessgeschwindigkeit der Lymphe gegenüber dem Blut in den Kapillaren angenommen (RIEGELMANN, 1973). Diese verminderte Flussrate führt wiederum zu einer Verkleinerung des Konzentrationsgradienten zwischen Gewebe und Lymphgefässystem. BINDER (1969) nahm bei seinen Untersuchungen mit unmarkierten Insulinen eine alleinige Absorption von Insulin durch das Blutkapillarsystem an.
Nicht nur die anatomisch-physiologischen Verhältnisse am Injektionsort sind für die Absorptionsgeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung, sondern auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der applizierten Substanz.
Je nach Art der gewünschten Wirkung kann man durch präparative Massnahmen Zubereitungsformen finden, die die Resorption steigern oder verringern, beschleunigen oder verzögern, z.B. kurz-oder langwir-

kende Insulinpräparate. Eine wesentliche Rolle zur Beeinflussung der Absorption spielen dabei Konzentration, Injektionsvolumen, Lipoid- und Wasserverteilungskoeffizient, ph-Wert und Viskosität. Durch Zusatz von Vehikelsubstanzen, die selbst keine therapeutischen Eigenschaften haben, kann der Wirkungseintritt des Arzneistoffes durch Änderung der Absorption beschleunigt oder verzögert werden.
Liegt die Wirksubstanz in fester Form - kristallin oder amorph - vor, so sind Partikelgrösse und Partikeloberfläche ein wesentlicher Parameter, da eine Absorption nur dann stattfinden kann, wenn der Wirkstoff in wässriger Lösung vorliegt. Die Auflösungsgeschwindigkeit, d.h. die Menge, des in Lösung gehenden Arzneistoffes pro Zeiteinheit, ist der Oberfläche des nicht aufgelösten Arzneistoffes direkt proportional. Mit abnehmender Partikelgrösse nimmt die Oberfläche zu. Im allgemeinen besitzt die amorphe Form eine grössere Löslichkeit, was eine raschere Absorption und damit ein schnelleres Einsetzen der therapeutischen Wirkung bedeutet.
Ist die Löslichkeit einer Substanz gering, so kann man annehmen, dass die Auflösung des Wirkstoffes langsamer erfolgt als die Geschwindigkeit der Absorption des sich bereits in Lösung befindlichen Arzneistoffes. Deshalb stellt die oft beobachtete langsame Absorption eines Medikamentes nicht die wahre sondern nur eine scheinbare Absorptionsgeschwindigkeit für diese Substanz dar, bedingt durch die langsame Auflösung am Applikations- oder Absorptionsort.

IV Einfluss der präparativen Insulinzubereitung auf die biologische Verfügbarkeit:

Nicht nur durch eine unterschiedliche Applikation - intravenös oder subkutan - kann der Wirkungsablauf exogenen Insulins wesentlich variiert werden, sondern auch durch Änderungen in der präparativen Insulingewinnung können Initialeffekt, Wirkungsmaximum und Wirkungsdauer entscheidend geändert werden.

Obwohl durch die Untersuchungen von MERING und MINKOSKI 1889 ein Kausalzusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Pankreas nachgewiesen wurde, dauerte es noch bis 1922, ehe BANTING und BEST Insulin aus dem Pankreas isolieren und therapeutisch am Menschen einsetzen konnten.

Wie wir heute wissen (SANGER, 1953), ist Insulin ein Proteohormon aus 51 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 6000. Das Hormon besteht aus 2 Peptidketten (A und B Kette), die über 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 5). Speziesunterschiede beruhen alleine auf einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz. Insulin wird in den ß-Zellen der Langerhans'schen Inseln zunächst in einer langen einkettigen Vorstufe gebildet, die biologisch wenig aktiv ist. Dieses sog. Proinsulin enthält 30 Aminosäuren zusätzlich zum Insulinmolekül in dem Verbindungsstück zwischen A-und B-Kette, das C-Kette oder C-Peptid genannt wird. Proinsulin wird in der ß-Zelle wahrscheinlich durch ein Trypsin-ähnliches Enzym in Insulin und C-Peptid gespalten.

Die Methoden der industriellen Extraktion und Reini-

A-Kette
B-Kette
Verbindungs-Peptid (C-Kette)
NH2-
-COOH
PHE
VAL
ASN
GLN
HIS
LEU
CYS
GLY
SER
HIS
LEU
VAL
GLU
ALA
LEU
TYR
LEU
VAL
CYS
GLY
GLU
ARG
GLY
PHE
PHE
TYR
THR
PRO
LYS
ALA
ARG
ARG
GLU
GLN
ASN
PRO
GLN
ALA
GLY
ALA
GLN

aufteilen: 1. Sammeln der Pankreata, 2. Extraktion und Reinigung des Insulins und 3. physikalische,chemische und biologische Prüfung der Insulinkristalle.
Nach mechanischer Zerkleinerung des gefrorenen Pankreasgewebes und Extraktion im sauren Alkoholmilieu werden nach Verdampfung des Alkohols die wasserlöslichen Substanzen entfernt und durch Zusatz von Kochsalz als Hydrochlorid Insulin ausgesalzen. Nach Einstellung des ph-Wertes auf den isoelektrischen Punkt mit einem ph-Wert von 4,0 - 5,5 fällt Insulin in amorphem Zustand aus. Die Kristallisation erfolgt durch Zinkionen und wird,um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen, mehrfach wiederholt. Trotz wiederholter Kristallisationen können durch eine Chromatographie immer noch sog. Nicht-Insulin-Komponenten nachgewiesen werden. Die Bezeichnung Nicht-Insulin-Komponente bezieht sich auf Proteine, die sich in ihrer Primärstruktur vom eigentlichen Insulin unterscheiden. Durch Chromatographie kann die sog. A-Fraktion, die vorwiegend pankreaseigene Proteine enthält, sowie die B-Fraktion, die überwiegend aus Proinsulin besteht, eliminiert und dadurch die Antigenität reduziert werden. Eine nochmalige Ionenaustauscher-Chromatographie führt zu den sog. hochgereinigten C-Komponenten. Die C-Komponente enthält zu 80% Insulin, welches in seiner Struktur der von SANGER (1953) beschriebenen Primärstruktur entspricht und nach einer nochmaligen Ionenaustauscher-Chromatographie als hochgereinigtes oder sog. Monocomponent Insulin oder single component insulin bezeichnet wird. Inzwischen sind fast alle handelsüblichen Insulinpräparate sog. MC-Insuline.

Durch die Sterilfiltration des gelösten Trockeninsulins gelingt die aseptische Herstellung des Insulins. Zusätze von Nipaginestern oder von anderen Konservierungsmitteln sollen vor allem die Sterilität während des Gebrauchs gewährleisten. Die Isotonie wird durch Zusatz von Glukose, Fruktose, Glycerin und Kochsalz erreicht.
Die biologische Aktivität wird in Relation zum 4. internationalen Insulinstandard bestimmt, wonach ein Milligramm 24 internationale Einheiten enthält (BANGHAM und MUSSET, 1959). Aufgrund der biologischen Bestimmungen besteht in der biologischen Aktivität der verschiedenen Spezies Insuline kein Unterschied.

Entsprechend ihrer Wirkungsdauer werden die verschiedenen Insulinpräparationen in drei Gruppen unterteilt:
Normal- bzw. Alt-Insulin auch reguläres Insulin genannt, war die erste Insulinzubereitung mit einer Wirkungsdauer von 5 - 6 Stunden nach subkutaner Applikation. Alt-Insulin kann als einziges Insulinpräparat bei schweren Stoffwechselentgleisungen intravenös angewandt werden. Die früher üblichen Alt-Insuline waren auf ein ph von 2,8 - 3,5 eingestellt, wegen besserer Hautverträglichkeit und Mischung mit neutralen Infusionslösungen werden heute vorwiegend neutrale Insuline benutzt. Als Puffersubstanz sind entweder Phosphat oder Acetat zugefügt.
Einen Wendepunkt in der Behandlung des Diabetes mellitus stellte die Entwicklung von Verzögerungs- oder Intermediärinsulinen dar. Der verzögerte Wirkungseintritt und die verlängerte Wirkungsdauer beruhen bei

allen Intermediärinsulinen auf einer verzögerten Absorption aus dem Injektionsdepot. Anfangs wurde die Schwerlöslichkeit durch Depotsubstanzen wie Surfen, Protamin und Human-Globulin erreicht, die Wirkungsdauer lag zwischen 10 und 20 Stunden. Erst HALLAS-MÖLLER und SCHLICHTKRULL (1951) gelang es, Verzögerungsinsuline auf rein kristalliner Basis mit Zinkionen ohne Depothilfsstoffe zu entwickeln. Die Zustandsform des Insulins im Präparat ist eine Lösung oder neutrale Suspension von entweder amorphen oder kristallinen Partikeln. In den Kombinationsinsulinen liegt das Insulin nicht nur als Kristallsuspension vor, sondern ein ganz genau bemessener Teil ist als amorphe Partikel in Lösung eingepasst. Wieweit freie Mischungen mit Alt-Insulinen möglich sind, um eine stärkere Initialwirkung zu erzielen, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Die Charakteristika der benutzten Insuline sind in Abb. 6 aufgeführt.
Die klinische Bedeutung der Langzeitinsuline mit einer Wirkungsdauer von mehr als 24 Stunden ist gering. Der Langzeiteffekt wird entweder durch Protamin und Zinkionenzusatz erreicht oder durch Surfen oder nur durch Kristallisation mit Zinkionen. Alle Langzeitinsuline liegen in amorpher oder kristalliner Suspension vor.

V Methoden zur Bestimmung der subkutanen Insulinabsorptionsraten:

Bislang verfügbare Untersuchungen zur Insulin-Pharmakokinetik stützten sich im wesentlichen auf

		physical state			pH		species			purity		retarding substances	effect		
		sol	susp. A	susp. C	a	n	P	B	PB	recryst.	highly purified	mg/100 units	initial	max. (hours)	final
RAPID	Regular (ALT. NORMAL)	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	½	3	6
INTERMEDIATE	NPH (isophane)	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	0.3–0.6 mg protamine	1½	6	18
	Depot (Horm)®	+	–	–	+	–	+	+	–	+	·	0.6 mg protamine + 0.15 mg Zn	1	5	18
	Semilente	–	+	–	–	+	+	–	–	+	+	0.2–0.25 mg Zn	1	5	14
	Lente	–	A & C		–	+	–	–	+	+	–	0.2–0.25 mg Zn	1½	8	26
	Monotard®	–	A & C		–	+	+	–	–	–	+	0.2–0.25 mg Zn	1½	6	18
	Depot(Hoechst)®	+	–	–	+	–	+	+	–	+	+	0.4 mg Surfen®	1½	4	16
	KOMB(Hoechst)®	+	–	–	+	–	+	+	–	+	+	0.28 mg Surfen®	1	3	14
	Globin insulin	+	–	–	+	–	+	+	–	+	+	2–4 mg globin + 0.3 mg Zn	1½	5	16
SLOW	ZPI (zinc protamine insulin)	–	+	+	–	+	+	+	+	+	–	1.25 mg protamine + 0.2 mg Zn	3	10	48
	Ultralente	–	–	+	–	+	–	+	–	+	–	0.2–0.25 mg Zn	3	10	72
	Long-insulin ®	–	A & C		–	+	+	–	–	+	+	0.12 mg Surfen®	3	8	26
BIPHASIC	Initard "	–	–	+	–	+	+	–	–	+	+	0.15–0.3 mg protamine	½	5	16
	Rapitard "	–	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–	½	7	24

Abb. 6: Charakteristika verschiedener Insulinpräparate, sol. = Lösung, susp. = Suspension, A = amorph, C = Kristallin, a = azid, n = neutral, P = Schweine-Insulin, B = Rinder-Insulin, PB = Mischinsulin Rind/Schwein (aus: R. Luft, 1976)

die indirekte Messmethodik, die im Jahre 1969 von BINDER im Zusammenhang dargestellt wurde. Dabei wird die radioaktive Strahlung, die über einer Hautpartie nach subkutaner Injektion von I^{125}-Insulin bei

Patienten mit Diabetes mellitus auftritt, mit einem Geigerzähler in wiederholten Abständen gemessen. Die Abklingquote der radioaktiven Emission, die oberhalb der Injektionsstelle registriert wird, gilt als Mass für die Absorption von intaktem Insulin von der Injektionsstelle in die Blutbahn (Abb. 7).

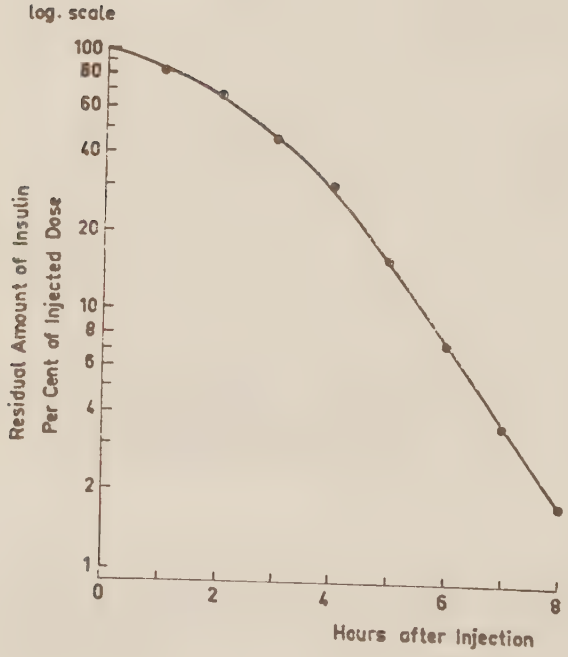

Abb. 7: Absorptionskurve nach Binder (1969)

Mit dieser Untersuchungstechnik wurden - in einer Reihe von Studien übereinstimmend - Absorptionsraten von Alt-Insulin-Präparaten mit einem linearen Verlauf bis zu 5 - 6 Stunden und mit einer Halbwertzeit von ca. 170 Minuten erarbeitet (MOORE, 1959; BINDER, 1969; KOIVISTO & FELIG, 1978; KOIVISTO, 1979).

Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den physikochemischen Vorgängen des Insulinabsorptionsprozesses und entsprechen in keiner Weise dem biologischen Wirkprofil von Alt-Insulin in der klinischen Anwendung. In der Tat haben Absorptionsuntersuchungen unter Verwendung einer direkten Messmethodik im Tierversuch für subkutan injiziertes Alt-Insulin eine Halbwertzeit - Degradation plus Absorption - von 35 Minuten ergeben (BERGER, 1979; Abb. 8).

Diese Diskrepanzen beruhen auf der Unhaltbarkeit einer Reihe von Prämissen, die von BINDER (1969) als Grundlage dieser indirekten Messmethodik angegeben wurden:
So ist es zweifelhaft, ob sich unter den speziellen Bedingungen dieses Experiments das jodierte Insulin tatsächlich identisch zu dem nativen Insulin verhält. Wesentlich schwerwiegender jedoch wiegt die Problematik der Integrität des Insulin-tracers nach der subkutanen Injektion. Bei der BINDER'schen Methodik muss die völlige Unversehrtheit des Insulinmoleküls im subkutanen Fettgewebe als Bedingung sine-qua-non für die Validität der Untersuchung vorausgesetzt werden.
Nach neueren Arbeiten von BERGER (1979) ist dies jedoch keineswegs der Fall: Ein signifikanter Anteil des subkutan injizierten Insulins wird an der Injektions-

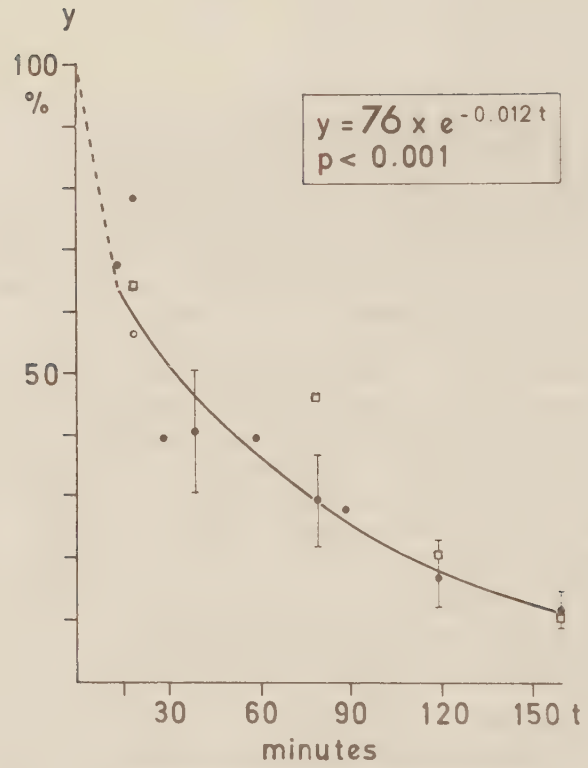

Abb. 8: Absorptionskurve nach Berger (1979)

stelle degradiert, d.h. man muss davon ausgehen, dass ein erheblicher Anteil des subkutan injizierten Insulins in loco abgebaut und inaktiviert wird. Diese Befunde, die inzwischen eine vielfache Bestätigung erfahren haben (LANCET-EDITORIAL, 1980; STEVENSON, 1980) machen die indirekte Methode für die Messung der Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins wie sie von BINDER angegeben wurde, für eine detaillierte Untersuchung der Insulinabsorption ungeeignet.

Es wurden daher in den letzten Jahren neue Methoden entwickelt, die eine direkte Erfassung der Insulinabsorption ermöglichen. Diese klinisch-experimentellen Verfahren gehen von einer unmittelbaren Messung zirkulierender Konzentrationen des subkutan injizierten, exogenen Insulins aus. Dabei kommen entweder ein neuartiger Insulin-tracer, das semisynthetische tritiierte Insulin von HALBAN und OFFORD (1975) oder die üblichen kommerziell erhältlichen Alt- und langwirkenden Insulin-Präparationen zur Anwendung.

Insbesondere bei der Untersuchung von Patienten mit Diabetes mellitus mit und ohne zirkulierende Insulin-Antikörper ist der Gebrauch von H^3-Insulinen zur Erfassung der Insulinabsorption geeignet. Dieser Insulin-tracer ist in seinen biologischen und immunologischen Eigenschaften sowie in seiner Degradation durch biologische Systeme nicht von nativem Insulin zu unterscheiden und kann - im Gegensatz zu den jodierten Insulin-Präparationen - beim Menschen direkt in vivo angewendet und direkt im Blut gemessen werden (BERGER, 1978; 1979; HALBAN, 1979).

Zur Darstellung von möglichen Veränderungen der Insulinabsorption eignet sich bei Normalpersonen und bei Patienten ohne zirkulierende Insulinantikörper besonders die direkte Messung des Einstromes exogenen Insulins in die Blutbahn.
Nachfolgend ist im Detail das von uns benutzte Versuchsmodell dargestellt. Die im Serum radioimmunologisch gemessenen Insulin-Konzentrationen

dienen dabei als Mass der aus dem subkutanen Depot absorbierten Hormonmenge.

B METHODEN und EXPERIMENTE

I Insulinabsorption aus dem Oberschenkeldepot bei Normalpersonen:

An dieser Untersuchung nahmen 25 gesunde, normalgewichtige männliche Versuchspersonen im Alter zwischen 20 - 26 Jahren teil. Akute oder chronische Erkrankungen lagen z.Zt. der Untersuchung anamnestisch nicht vor. Keiner der Probanden stand unter einer medikamentösen Therapie.
Nach einer Nahrungskarenz von 8 - 12 Stunden wurde morgens nüchtern gegen 8.3o Uhr in der Ellenbeuge über einen Teflonkatheter ein venöser Zugang gelegt und mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung für Blutentnahmen offen gehalten. Nach einer Vorperiode von 0 - 15 Minuten mit zweimaligen Blutentnahmen bei -15 und 0 Minuten wurden 10 E Actrapid^{R} subkutan in die Vorderseite des Oberschenkels injiziert. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass die Injektionen unter gleichem Injektionswinkel, bei gleicher Injektionstiefe und mit gleicher Injektionsgeschwindigkeit erfolgten. Für alle Untersuchungen wurden einmal Injektionsnadeln und -spritzen derselben Herstellerfirma benutzt (Asik, Dänemark). Um ein Zurückfliessen des applizierten Insulins aus dem Stichkanal zu vermeiden, verblieb die Injektionsnadel noch 10 - 15 Sekunden nach der In-

jektion liegen. Die Blutentnahmen zur Bestimmung von Insulin, C-Peptid, Wachstumshormon (STH), Cortisol, Glukagon, freie Fettsäuren, Lactat, Pyruvat und Ketonkörpern (Acatoacetat+ß-Hydroxybutyrat) erfolgten in bestimmten Abständen bis 300 Minuten nach der Insulin-Applikation. Während der gesamten Untersuchung ruhten die Probanden in liegender Position bei Raumtemperatur.

I, 1. Analytische Methoden:

Die Bestimmung der Stoffwechselmetabolite erfolgten mit Routine-Labormethoden: Glukose (GRADY & LAMAR, 1959), freie Fettsäuren (LOCHNER & NASSERI, 1969), Lactat (HOHORST, 1970), Pyruvat (BÜCHER, 1963), Ketonkörper als Summe aus ß-Hydroxybutyrat (WILLIAMSON, 1970) und Acetoacetat (MELLANBY, 1970)

Mit Hilfe spezifischer Radioimmunoassays wurden die Serum-Konzentrationen von Insulin [IRI] (WIDE, 1959), C-Peptid (KANEKO, 1974), Wachstumshormon [STH] (WIEGELMANN, 1973) und die Plasmaspiegel von Cortisol (KLEY, 1977) und Glukagon - mit dem 30 K-Antikörper - von UNGER (1970) gemessen.

I, 2. Statistische und pharmakokinetische Berechnungen:

Folgende statistische Berechnungen wurden benutzt:

A) Mittelwert: $\bar{x} = \frac{x_i}{n}$

n = Anzahl der Messungen

B) Standardabweichung (SD):

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

C) Mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM):

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_x^2}{n}}$$

D) Der Unterschied zwischen zwei Mittelwerten von verschiedenen Gruppen wurde anhand des t-Testes nach Student auf Signifikanz geprüft:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_{x_1}^2}{n_1} + \frac{s_{x_2}^2}{n_2}}}$$

Wurden identische Gruppen unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht, so wurden die Unterschiede mit dem gepaarten t-Test auf Signifikanz geprüft:

$$t_{n-1} = \frac{\bar{d}}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

wobei $\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$ oder $= \bar{x}_1 - \bar{x}_2$, ist, in Worten dem Mittelwert der Differenzen oder der Differenz der Mittelwerte entspricht. s_d ist die Standardabweichung der Differenzen.
$p < 0,05$ wurde entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% als signifikant angenommen.

E) Berechnung von $Conc._{max.}$ und $T_{conc.max.}$:

Aus den höchsten Serum-Insulin-Spiegeln der einzelnen Probanden einer Untersuchungsgruppe wurde die maximale Hormonkonzentration - $IRI\text{-}Conc._{max.}$ in µU/ml - errechnet. Der Zeitpunkt, zu dem die maximale Insulin-Konzentration erreicht wurde, wird als $T_{max.}$ Minuten der jeweiligen Untersuchungsgruppe bezeichnet. Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM.

F) Berechnung der Fläche unter der Insulin-Konzentrations-Zeitkurve:

Die Fläche unter der Hormonkurve (AUC = area under the curve) wurde berechnet unter Auflösung des

Flächenintegrals nach der Trapezoidregel (KLOTZ, 1979) und Aufsummation der trapezförmigen Segmente nach:

$$Cdt = AUC = \frac{1}{2} (y_{n-1} + y_n) \cdot (x_n - x_{n-1})$$

mit y = Konzentration am jeweiligen Messpunkt
und x = Zeit am jeweiligen Messpunkt

G) Berechnung der prozentualen Bioverfügbarkeit von Insulin:

Aus den Flächen der Insulin-Konzentrations-Kurven der verschiedenen Versuchsbedingungen wurde die prozentuale Bioverfügbarkeit des injizierten Insulins innerhalb der ersten 90 Minuten errechnet (RITSCHEL, 1973):

$$\% \text{ BV} = \frac{AUC_x}{AUC_s} \cdot 100$$

BV = Bioverfügbarkeit,
AUC_s = Standardfläche der Kontrollgruppe, die mit 100% angenommen wurde.
AUC_x = jeweilige Vergleichsfläche, die Abweichungen vom Kontrollkollektiv werden als $\triangle$ % angegeben.

I, 3. Ergebnisse:

Die Abb. 9 zeigt die hormonellen und metabolischen Untersuchungsergebnisse nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in den Oberschenkel bei Raumtemperatur.
Die Serum-Insulin-Konzentration steigt von einem Ausgangswert von 7,20 $\pm$ 0,7 µU/ml auf ein Plateau zwischen der 40. und 150. Minute von ca. 17 µU/ml an und fällt danach wieder langsam ab und liegt nach 300 Minuten bei 8,80 $\pm$ 0,90 µU/ml. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant vom Ausgangswert ($p > 0,05$). Die maximale Serum-Insulin-Konzentration - IRI-Conc.$_{max.}$ - liegt bei 22,20 $\pm$ 1,20µU/ml und wird nach 91,60 $\pm$ 10,90 Minuten als IRI-$T_{max.}$ errechnet. Die Fläche unter der Serum-Insulin-Konzentrations-Zeitkurve - AUC - beträgt innerhalb der ersten 90 Minuten 1295 $\pm$ 133 µU/ml x min.
Sechzig bis 90 Minuten nach der Insulin-Applikation ist der Blutglukose-Spiegel von anfangs 93 mg/dl auf 60 -50 mg/dl abgefallen. Ein weiteres Absinken des mittleren Blutglukose-Spiegels unter die 50 mg/dl wird einmal durch die Hemmung der endogenen Insulin-Sekretion verhindert. Als Parameter für die endogene Insulin-Produktion wurde der Serum-C-Peptid-Spiegel bestimmt. Die C-Peptid-Konzentration sinkt von basal 2,8 ng/ml auf 1,0 ng/ml nach 90 Minuten ab und liegt bei Versuchsende nach 300 Minuten an der unteren Nachweisgrenze von 0,40 ng/ml.
Die kontrainsulinären Hormone (Abb. 10) Cortisol, Wachstumshormon und Glukagon verhindern ebenfalls einen weiteren Blutzuckerabfall. Der Plasmaglukagonspiegel steigt von basal 111 pg/ml kontinuierlich an

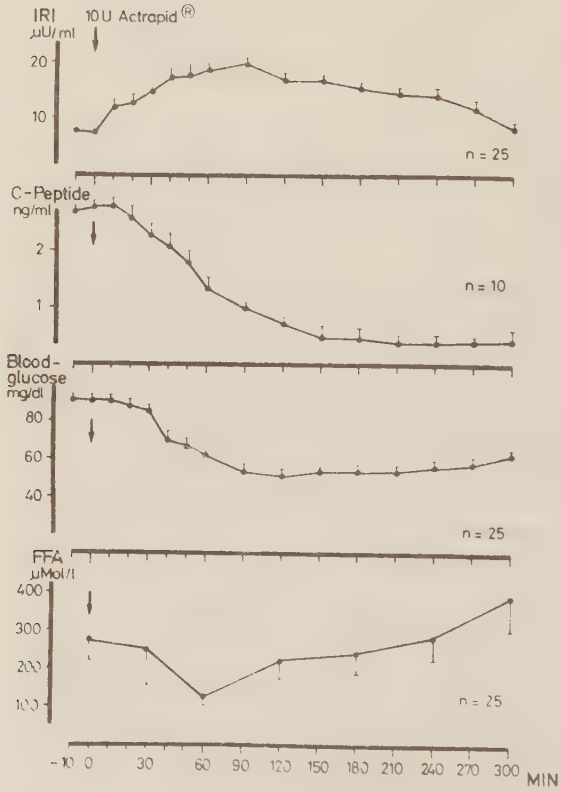

Abb. 9: Serum-Insulin-Konzentration, Serum-C-Peptid-, Blutglukose- und freie Fettsäuren-Konzentration nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} bei Normalpersonen in den Oberschenkel bei Raumtemperatur (Kontrollgruppe).

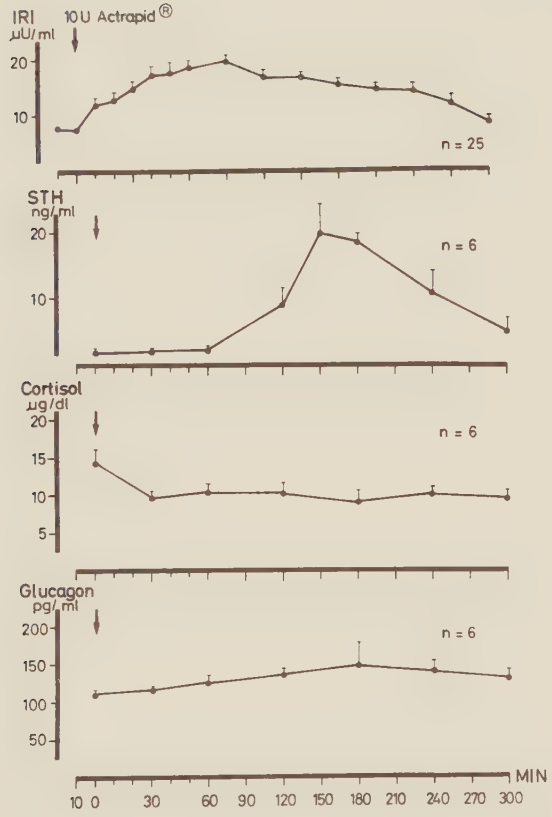

Abb. 10: Serum-Insulin-, Wachstumshormon (STH)-, Cortisol- und Plasma-Glukagon-Konzentration nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in den Oberschenkel. Mittelwerte ± SEM.

und erreicht mit 148,90 pg/ml nach 240 Minuten die höchste Konzentration. Der Wachstumshormonspiegel zeigt erst nach 120 Minuten eine signifikant höhere Konzentration gegenüber dem Basalwert. Der höchste Wachstumshormonspiegel wird mit 20,50 ng/ml nach 150 Minuten erreicht. Danach fällt die Hormonkonzentration wieder ab und liegt nach 300 Minuten bei 5,90 ng/ml. Der Plasma Cortisolspiegel zeigt zu Beginn der Untersuchung mit 14,30 µg/dl den höchsten Wert und verbleibt dann während der gesamten Versuchsdauer bei ca. 10 µg/dl.

Die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum sinkt von 272 $\pm$ 63 µMol/l zu Beginn der Untersuchung auf 121 $\pm$ 30 µMol/l nach 60 Minuten ab und steigt danach wieder kontinuierlich an und liegt bei Versuchsende bei 398 $\pm$ 103 µMol/l. Die Serum-Pyruvat-Konzentration fällt von 0,10 mMol/l auf 0,06 mMol/l (Abb. 11). Die Laktat-Spiegel steigen von 0,74 mMol/l auf 0,99 mMol/l bis zur 180. Minute an und fallen danach wieder ab. Die Blutketonkörper (Acetoacetat+ ß-Hydroxybutyrat) zeigen nach 240 Minuten mit 0,21 mMol/l die höchste Serum Konzentration.

I, 4. Diskussion:

Unter den o.g. Versuchsbedingungen kommt es zu einem raschen Blutzuckerabfall innerhalb der ersten 60 - 90 Minuten, anschliessend steigt der Blutglukose-Spiegel unter dem Einfluss der kontrainsulinären Hormone insbesondere durch das Glukagon und das Wachstumshormon wieder an, während die Plasma Cortisolspiegel durch den Blutzuckerabfall unbeeinflusst blieben. Der initiale steile Blutzuckerabfall hat eine Blockierung der endo-

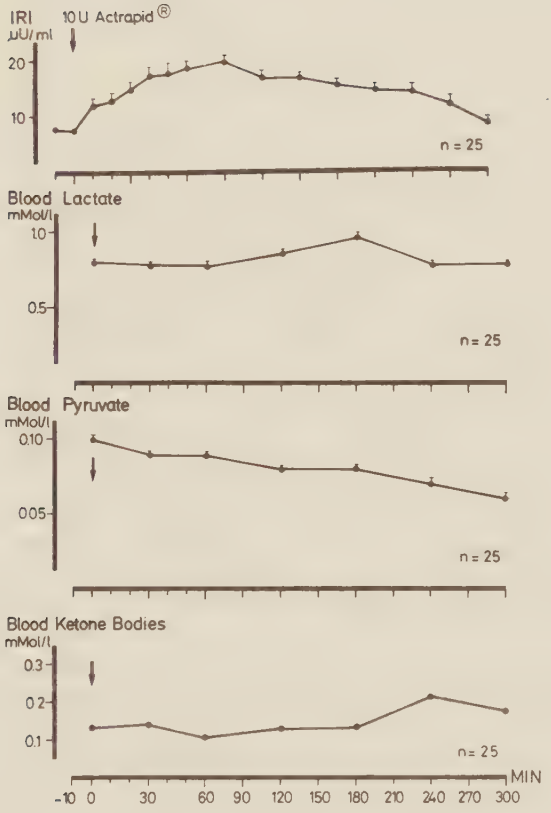

Abb. 11: Effekte von 10 E Actrapid^{R} subkutan in den Oberschenkel injiziert auf die Serum Konzentration von Lactat, Pyruvat und Ketonkörper (Acetoacetat+ß-Hydroxybutyrat). Mittelwerte ± SEM.

genen Insulinsekretion zur Folge. Diese wird durch die unverzügliche Senkung der Serum-C-Peptid-Spiegel dokumentiert. In der Tat zeigt die Kinetik des Serum-C-Peptid-Abfalls (Halbwertzeit für Serum-C-Peptid 30 - 40 Minuten) ein promptes und totales Sistieren der ß-Zellfunktion an. Entsprechend der wesentlich kürzeren Halbwertzeit des Serum-Insulins (ca. 4 Minuten, HALBAN, 1979) ist damit die praktisch vollständige Elimination des Anteils von endogenem Insulin an der gesamten Insulin-Immunoreaktivität innerhalb weniger Minuten nach der Insulin-Applikation des exogenen Insulins belegt. Damit wird der ansteigende Teil der Serum-Insulin-Zeitkurve (Abb. 9), d.h. in der Zeit von 0 - 60 Minuten aufgrund der klassischen Berechnungen von TEORELL (1957) und SCHOU (1961) zu einem validen Indikator für die Absorption subkutan injizierten intakten Insulins. Dabei werden die Steilheit (IRI-$T_{max.}$) und die Höhe (IRI-$Conc._{max.}$) der Serum-Insulin-Zeitkurve direkt durch das Ausmass und die Geschwindigkeit der Absorption des intakten Anteils des exogenen Insulins bestimmt.

Unter Standardbedingungen konnten wir für die Parameter IRI-$T_{max.}$ und IRI-$Conc._{max.}$ der Insulin-Spiegel-Zeitkurve einen Variationskoeffizienten von unter 10% feststellen. Auch der Verlauf der übrigen hormonellen und metabolischen Parameter (Abb. 10 + 11) unter der Insulin induzierten Hypoglykämie ist regelhaft und weist unter Kontrollbedingungen auf ausserordentlich geringe Schwankungsbreiten dieses experimentellen Modells hin.
Mit dieser oben im einzelnen aufgeführten, von uns in den letzten Jahren erarbeiteten Methodik wurden

eine Reihe möglicher Variationen in der Absorptionskinetik von subkutan injiziertem Insulin untersucht.

C VERÄNDERUNGEN der INSULIN - ABSORPTION

I Wechsel der Injektionsstelle:

In vielen Schulungsprogrammen für Diabetiker wird ein täglicher Wechsel des subkutanen Injektionsortes zur Vermeidung von Lipodystrophien oder Hautindurationen empfohlen (MEHNERT-SCHÖFFLING, 1974). Eine conditio sine qua non für eine dauernde Stabilisierung der Normoglykämie und zur Vermeidung einer Hypoglykämie ist, dass die Absorptionsrate und damit die Bioverfügbarkeit von exogenem Insulin aus den topographisch differenten subkutanen Injektionsdepots gleich ist. Da die in der Literatur dazu mitgeteilten Befunde ausschliesslich mit der indirekten Methode (JOINER, 1959; NORA, 1964; BINDER, 1969; KOIVISTO, 1980) durchgeführt wurden, haben wir bei 4 Normalpersonen die Absorption von Alt-Insulin an drei verschiedenen Körperregionen geprüft.

I, 1. Versuchsablauf:

In randomisierter Reihenfolge erhielten 4 männliche, normgewichtige Versuchspersonen 10 E Actrapid^{R} subkutan in Oberarm, Bauch und Oberschenkel injiziert. Der weitere Versuchsablauf einschliesslich der gemessenen

hormonellen und metabolischen Parameter entsprach der o.g. Kontrollgruppe.

I, 2. Ergebnisse:

Die Abb. 12 zeigt in der oberen Hälfte die Serum-Insulin-Konzentrationen nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in topographisch unterschiedliche Körperregionen. Die Absorption von exogenem Insulin aus dem subkutanen Depot der Bauchhaut in die Zirkulation ist gegenüber der Kontrollgruppe - nach Oberschenkelinjektion - im direkten Paarvergleich signifikant beschleunigt und erhöht. Signifikant höhere Serum-Insulin-Spiegel werden zwischen der 30. und 60. Minute gemessen ($p < 0,05$). Nach Injektion von Alt-Insulin in den Oberarm verläuft die Absorption von Insulin in das Kreislaufsystem zwar langsamer als aus dem Bauchhautdepot, jedoch schneller als aus dem Oberschenkeldepot. Signifikant höhere Serum-Insulin-Spiegel sind hier zwischen der 50. und 60. Minute nach Insulin-Applikation nachweisbar ($p < 0,05$). Die maximale Serum- Insulin-Konzentration IRI-$Conc._{max.}$ liegt nach abdomineller Injektion bei 27,25 $\pm$ 4,75 µU/ml, nach Oberarm-Injektion bei 24,10 $\pm$ 2,25 µU/ml (Tab. 1). Die Berechnung von IRI-$T_{max.}$ der Zeitdauer, in der die maximale Hormonkonzentration erreicht wurde, ist mit 62,50 $\pm$ 9,50 Minuten nach abdomineller Injektion von Insulin gegenüber der Kontrollgruppe mit 91,60 $\pm$ 10,90 Minuten signifikant verkürzt. Nach subkutaner Oberarm-Injektion von Insulin beträgt hier IRI-$T_{max.}$ 75,90 $\pm$ 8,70 Minuten. Dieser Unterschied ist gegenüber der Kontrollgruppe jedoch nicht statistisch gesichert.
Die Berechnung der Flächen unter den Serum-Insulin-

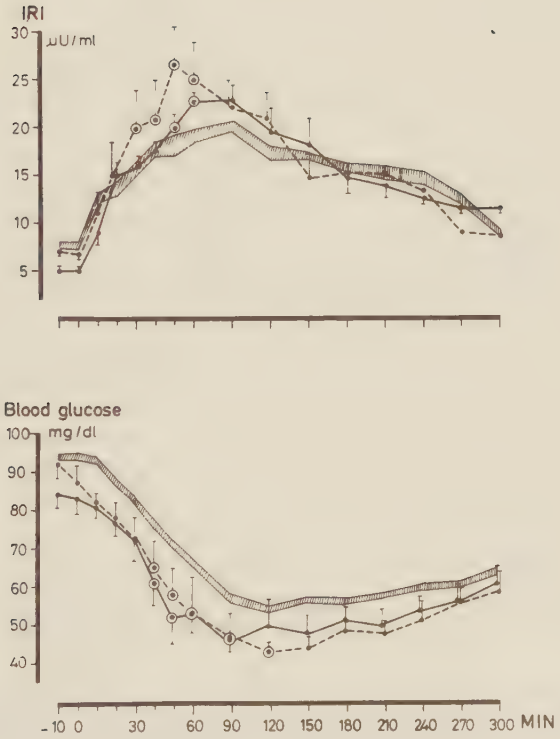

Abb. 12: obere Bildhälfte: Serum-Insulin-Spiegel nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in unterschiedliche Körperregionen: Oberschenkel (Kontrollgruppe n= 25) schraffierte Fläche, --------- Bauchhaut (n= 4) und Oberarm (n= 4), ——— Mittelwerte ± SEM, ⊙ $p < 0,05$, statistisch signifikant im gepaarten t-Test zur Kontrollgruppe.
untere Bildhälfte: zeigt die entsprechenden Blutglukose-Spiegel, die Symbolik ist die gleiche, wie oben.

	IRI CONC. MAX. (uU/ML)	$T_{MAX.}$ (MIN.)	AUC (0-90 MIN.) (uU/ML x MIN.)
THIGH INJECTION (N = 25, CONTROLS)	22,24 ± 1,23	91,6 ± 10,9	1295 ± 133
ARM INJECTION (N = 4)	24,10 ± 2,25	75,9 ± 8,7	1602 ± 116*
ABDOMINAL INJECTION (N = 4)	27,25 ± 4,75	62,5 ± 9,5*	1921 ± 187*

Tab. 1: Pharmakokinetische Parameter nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^R in unterschiedliche Körperregionen errechnet aus der Serum-Insulin-Konzentration als IRI-Conc.$_{max.}$ aus der Zeit, als $T_{max.}$ und der Fläche unter der Insulin-Konzentrations-Zeitkurve als AUC, Mittelwerte ± SEM, * signifikant different im gepaarten t-Test zur Kontrollgruppe $p < 0,05$).

Konzentrations-Zeitkurven von 0 bis 90 Minuten nach der Insulin-Applikation ergibt signifikant höhere Werte

nach der Bauchhaut-Injektion 1921 ± 187 µU/ml x min., nach der Oberarm-Injektion 1602 ± 116 µU/ml x min. und nach der Oberschenkel-Injektion 1295 ± 133 µU/ml x min. (Tab. 1). Bei der Bestimmung der biologischen Verfügbarkeit von Insulin im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit 100% angenommen wurde, kommt es zu einer Steigerung der Bioverfügbarkeit von Insulin innerhalb der ersten 90 Minuten nach Oberarm-Injektion um 20% und nach subkutaner Injektion von Insulin in die Bauchhaut um 50% (Abb. 13).
Dass mehr Insulin biologisch wirksam zur Verfügung steht, zeigen auch die entsprechenden Blutglukose-Spiegel (Abb. 12 untere Hälfte). Der Blutzuckerabfall nach der subkutanen Injektion von Insulin in den Oberarm bzw. in die Bauchhaut ist steiler und tiefer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied ist zwischen der 40. und 120. Minute statistisch signifikant ($p < 0,05$).
Die metabolischen Parameter Lactat, Pyruvat, Ketonkörper und freie Fettsäuren zeigen keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrollgruppe.

I, 3. Diskussion:

Ein regionaler Wechsel der subkutanen Injektionsstelle führt zu einer Änderung der Absorptionskinetik von exogenem Insulin: so wird der Initialeffekt und das Wirkungsmaximum von Alt-Insulin nach subkutaner Injektion in die Bauchhaut und in den Oberarm schneller erreicht als nach Oberschenkelinjektion. Entsprechend signifikante Unterschiede der hypoglykämischen Wirkung der Serum-Insulin-Spiegel lassen sich nachweisen. Der Blutglukose-Abfall nach der Injektion von Insulin in

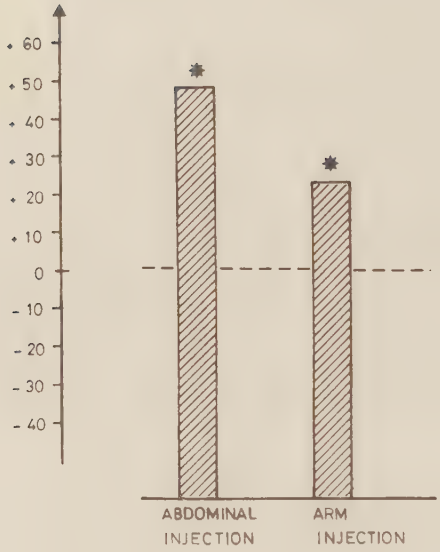

Abb. 13: Änderungen der prozentualen biologischen Verfügbarkeit von subkutan injiziertem Insulin durch Variation des Injektionsortes (n= 4) innerhalb der ersten 90 Minuten nach der Insulin-Applikation. Abweichungen von der Kontrollgruppe (nach Oberschenkel-Injektion, n= 25), die mit 100% angenommen wurde (----- Linie) sind als Δ % dargestellt. * $p < 0.05$ zur Kontrollgruppe im gepaarten t-Test.

die Bauchregion war erheblich stärker als nach der Injektion in den Oberschenkel. Die Insulin-Injektion in den Oberarm nahm eine Zwischenstellung in der biologi-

schen Verfügbarkeit von exogenem Insulin ein. Diese substantiellen Unterschiede in der Absorption subkutan injizierten Insulins von verschiedenen Körperregionen können durch eine unterschiedliche Kapillardichte in den verschiedenen Regionen bedingt sein (RYAN, 1973). Zusätzlich könnten zu der verlangsamten Absorption Unterschiede in der lokalen Degradation von subkutan injiziertem Insulin ursächlich zu diesen Befunden beitragen.

Aus diesen eindeutigen Befunden ergab sich die konkrete Notwendigkeit einer Veränderung unseres Diabetiker-Edukations-Programms: Ein ungeregelter Wechsel der Injektionsstelle von einer der oben untersuchten Regionen zur anderen kann durch die damit verbundene Veränderung der Bioverfügbarkeit des exogenen Insulins zu erheblichen Störungen und Entgleisungen der Stoffwechseleinstellung beim Diabetiker vom juvenilen Typ führen. Es sollten daher Rotationen der Insulin-Injektionsstelle grundsätzlich auf eine anatomische Körperregion beschränkt bleiben. Andererseits kann durch einen gezielten Wechsel der Injektionsstelle von der Oberschenkelregion zum Abdomen hin eine - häufig erwünschte - Beschleunigung des biologischen Effektes subkutan injizierten Insulins erreicht werden.

II Mischbarkeit von Insulinpräparationen:

In den letzten Jahren hat sich die Verwendung von Alt-Insulin-Präparaten, meist in der Kombination mit längerwirkenden Insulinen in der Behandlung des juvenilen Typ Diabetes wieder mehr durchgesetzt. Wir

empfehlen heute die freie Mischung eines Alt-Insulins mit einem Verzögerungs-Insulin am Morgen als Methode der Wahl in der Insulintherapie von jungen Diabetikern (JÖRGENS, 1979). Bei der zunehmenden Verwendung von Alt-Insulin-Präparaten kommt der Berücksichtigung der Variabilität der Insulin-Absorption eine besondere Rolle zu. Ob jede freie Mischung von Kurz- mit langwirkenden Insulinen möglich ist, soll mit der Kombination folgender Insulin-Präparate untersucht werden: Actrapid^{R} und Monotard^{R} und Leo Alt^{R} und Leo-NPH retard^{R}.

II, 1. Versuchsablauf:

An der Untersuchung nahmen 12 gesunde, normgewichtige, männliche Versuchspersonen teil, die in zwei Gruppen aufgeteilt wurden: eine Gruppe erhielt Actrapid^{R} und Monotard^{R}, die andere Gruppe Leo Alt^{R} und Leo NPH retard^{R}. Nach einer Randomisierungsliste erhielten die Probanden im Wechsel 10 E Alt-Insulin und 16 E Verzögerungsinsulin in folgender Kombination:

A) 10 E Actrapid^{R} allein s.c. in den Oberschenkel injiziert,
B) 10 E Actrapid^{R} + 16 E Monotard^{R} getrennt s.c. in beide Oberschenkel injiziert,
C) 10 E Actrapid^{R} + 16 E Monotard^{R} in einer Spritze gemischt und sofort s.c. in den Oberschenkel injiziert,
D) 10 E Actrapid^{R} + 16 E Monotard^{R} gemischt und nach 5 Minuten s.c. in den Oberschenkel injiziert.

Für die Kombination Leo Alt^{R} und Leo NPH retard^{R} wurde der gleiche Versuchsablauf gewählt. Nach einer Vorperiode von 10 Minuten wurde bei 0 Minuten Insulin

injiziert und folgende Parameter über 150 Minuten gemessen: Serum Insulin, Blutglukose, freie Fettsäuren, Lactat, Pyruvat und Ketonkörper. Nach Abschluss der Untersuchung nahmen die Probanden eine kohlenhydratreiche Mahlzeit ein, um mögliche Hypoglykämien zu vermeiden.

II, 2. Ergebnisse:

Abb. 14 zeigt die Effekte von freien Insulinmischungen auf die Absorption des kurzwirkenden Insulins. Freie Kombinationen der gewählten Insulin-Präparate sind mit einer Ausnahme möglich: Wird Actrapid^{R} und Monotard^{R} gemischt und erst 5 Minuten später subkutan injiziert, so verläuft der ansteigende Teil der Serum-Insulin-Kurve flacher, die Unterschiede sind gegenüber einer sofortigen Injektion von Actrapid^{R} und Monotard^{R} unmittelbar nach dem Mischen signifikant. Auch die Berechnung von IRI-$T_{max.}$ ist mit 110 $\pm$ 11 Minuten verlängert, während die Bestimmung von IRI-Conc.$_{max.}$ keine signifikanten Unterschiede in den gewählten Kombinationen erbrachte. Die Berechnung der prozentualen Bioverfügbarkeit von Insulin innerhalb der ersten 90 Minuten zeigt eine Reduktion der biologisch verfügbaren Insulinmenge bei Injektion des Insulingemisches 5 Minuten nach der Vermischung der Präparate um ca. 20%.
Unterschiede in den metabolischen Parametern Glukose, freie Fettsäuren, Lactat, Pyruvat und Ketonkörper waren bei den gesunden Versuchspersonen nicht nachweisbar.

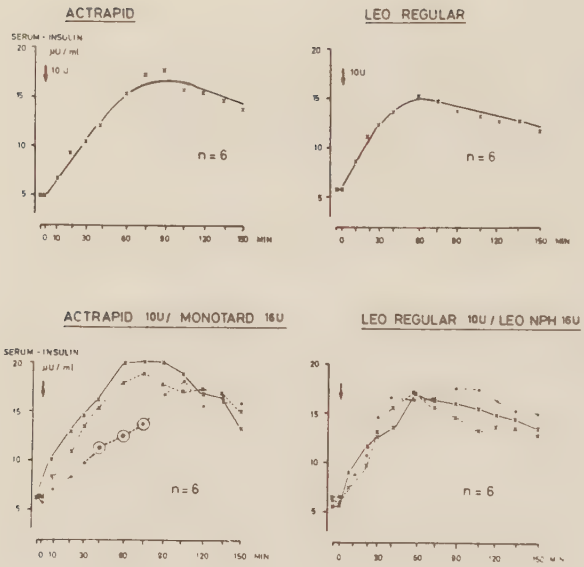

Abb. 14: Effekte von freien Insulinmischungen (kurz- und langwirkende Insuline) auf die Absorption des kurzwirkenden Insulins. Die linke obere Bildhälfte zeigt die Serum-Insulin-Konzentration nach Applikation von 10 E Actrapid^{R} in den Oberschenkel, die untere linke Hälfte zeigt die Serum-Insulin-Konzentration nach Mischung von Actrapid^{R} (10 E) mit Monotard^{R} (16 E) bei folgendem Versuchsablauf: a) ———— Serum-Insulin-Spiegel nach getrennter Injektion von Actrapid^{R} und Monotard^{R} in beide Oberschenkel, b ----- Serum-Insulin-Spiegel nach Mischung von Actrapid^{R} und Monotard^{R} und sofortiger Injektion, c) ····· Serum-Insulin-Spiegel nach Mischung von Actrapid^{R} und Monotard^{R} und Injektion nach 5 Minuten. Die gleiche Versuchsanordnung und Symbolik wurde für Leo Alt^{R} und Leo NPH^{R} Insulin rechte Bildhälfte gewählt ⊙ $p < 0,05$ im gepaarten t-Test zu b.

II, 3. Diskussion:

Mitteilungen in der Literatur zeigen, dass sich durch eine Kombination von kurz- und langwirkenden Insulinen in besonders hohem Masse optimale Stoffwechseleinstellungen erreichen lassen (JOVANVIC 1980; TCHOBROUTSKY, 1980). Untersuchungen über die Absorptionskinetik dieser Insulinmischungen und die anzuwendende Mischtechnik liegen aber bislang nicht vor. Einzelbeobachtungen von HARROWER (1975) auf den Blutglukoseverlauf von insulinpflichtigen Diabetikern zeigten, dass die Mischung von Alt-Insulin mit Protamin-Zink-Insulin zu einer geringeren Wirkung des Alt-Insulins auf die Blutglukose führt, während die Depotwirkung verstärkt wird. Injizierte er über dieselbe Kanüle nacheinander beide Insuline in getrennten Spritzen, so fanden sich im Blutzuckerverlauf gegenüber einer vollkommen getrennten Injektion von Alt-Insulin und Protamin-Zink-Insulin keine Unterschiede. Ursächlich diskutiert HARROWER eine Konversion von Alt-Insulin in Protamin-Zink-Insulin durch freie Zinkionen. Unsere Untersuchungen zur Absorptionskinetik freier Insulinmischungen zeigen nur dann eine verlangsamte Absorption für Alt-Insulin in der Kombination Actrapid^{R} - Monotard^{R}, wenn die Injektion mit einer Verzögerung von nur 5 Minuten nach der Mischung erfolgte. Auch hier muss man annehmen, dass ein Teil der Alt-Insulin-Komponente durch überschüssige Zinkionen des Monotard^{R} Insulins gebunden wird und als amorphes Insulin mit intermediärer Wirkung ausfällt. Gestützt werden diese Befunde durch eine Verminderung der Insulinbioverfügbarkeit innerhalb der ersten 90 Minuten nach der Insulin-Applikation. Freie Mischungen von Leo Alt^{R}

und Leo NPH retard^{R}, das nur Protamin als Verzögerungssubstanz enthält, sind ohne Änderungen der Alt-Insulin Wirkung möglich (Abb. 14).

III Änderungen der Insulin-Absorption durch Temperatur-Effekte und Massage der Injektionsstelle:

Von besonderer klinischer Bedeutung für die Absorption und hypoglykämische Wirkung subkutan injizierten Insulins dürften alltägliche Temperaturveränderungen sein, weil zu erwarten ist, dass sie über eine Veränderung der Hautdurchblutung (ASCHOFF, 1958) und der Dichte funktioneller Kapillaren auf die Mobilisation des subkutanen Insulindepots einwirken.

III,1. Untersuchungsverlauf:

Untersucht wurde die Bedeutung eines warmen (42°C) und eines kalten (22° C) Wannenbades für 30 Minuten unmittelbar nach der subkutanen Injektion von 10 E Actrapid^{R} in die Vorderseite des Oberschenkels, ferner die Absorption von Insulin im warmen Bad nach Wechsel der Injektionsstelle vom Oberschenkel zum Oberarm. Mit der Auflage einer ca. 60° C warmen Wärmeflasche für 30 Minuten auf die subkutane Injektionsstelle wurden die Effekte lokaler Wärme auf die Insulinabsorptionsrate geprüft. Der Einfluss eines Saunabades von 30 Minuten - unterbrochen für jeweils 5 Minuten zur Blutentnahme - bei 85° C. Neben lokaler und systematischer Temperaturvariation wurde zusätzlich noch die Beeinflussung der Insulin-Absorption durch eine Massage der

Injektionsstelle über 30 Minuten geprüft. Nach Beendigung der jeweiligen Manipulationen ruhten die Versuchspersonen in liegender Position bei Raumtemperatur bis zum Ende des Experimentes nach 300 Minuten. Als Vergleichsdaten wurden die Ergebnisse herangezogen, die nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in den Oberschenkel oder Oberarm bei Raumtemperatur gewonnen wurden. Gemessen wurden Serum-Insulin, C-Peptid, Wachstumshormon, Cortisol, Glukagon, Glukose, Lactat, Pyruvat, freie Fettsäuren und Ketonkörper. In der Folge werden jeweils nur die Parameter dargestellt, die im Rahmen der o.g. Fragestellung relevant sind.

III, 2. Ergebnisse:

Abb. 15 zeigt die Effekte eines kalten und warmen Wasserbades auf die Insulin-Absorption aus dem subkutanen Oberschenkeldepot. Im Vergleich zur Kontrolluntersuchung bei Raumtemperatur ist der Serum-Insulin-Anstieg durch das warme Bad beschleunigt und erhöht. Signifikant höhere Insulin-Spiegel werden zwischen der 1o. und 60. Minute gemessen. Der maximale Serum-Insulin-Spiegel - IRI-Conc.$_{max.}$ - liegt bei 32,67 $\pm$ 4,33 µU/ml und wird bereits nach 30,00 $\pm$ 3,70 Minuten - IRI-T$_{max.}$ - erreicht (Tab. 2). Beide Parameter unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Bei der Wassertemperatur von 22° C ist die Insulin-Absorption aus dem subkutanen Oberschenkeldepot sowohl verzögert als auch vermindert. Signifikant niedrigere Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe werden zwischen der 1o. und 60. Minute nach der Insulin-

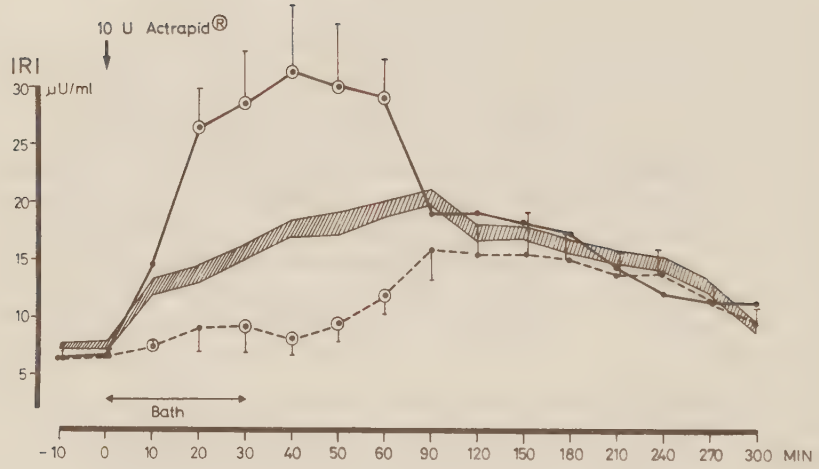

Abb. 15: Beeinflussung der Insulin-Absorption durch Änderung der Umgebungstemperatur. Die schraffierte Fläche zeigt die Kontrollgruppe nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid® in den Oberschenkel bei Raumtemperatur (n= 25) ——— zeigt die Serum-Insulin-Konzentration nach einem warmen Bad (42° C) für 30 Minuten unmittelbar nach der Insulin-Applikation (n= 6). ------ Serum-Insulin-Konzentration nach einem kalten Bad (22° C) für 30 Minuten unmittelbar nach der Insulin-Applikation (n= 6). Mittelwerte ± SEM, bei ⊙ $p < 0,05$ Unterschied statistisch signifikant im gepaarten t-Test zur Kontrollgruppe.

Applikation nachgewiesen. Die maximale Serum-Insulin-Konzentration - IRI-Conc.$_{max.}$ - liegt bei 19.17 ± 3,02 µU/ml und wird nach IRI-$T_{max.}$ 135,oo ± 16.10 Minuten erreicht. IRI-$T_{max.}$ ist damit gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verlängert (Tab. 2). Nach 90 Minuten unterscheiden sich die gemessenen Serum-Insulin-Spiegel der drei Versuchsgruppen nicht mehr voneinander.

Die Berechnung der Flächen unter den Serum-Insulin-Konzentrations-Zeitkurven innerhalb der ersten 90 Minuten nach der Insulin-Applikation ergibt nach dem warmen Bad 2201,4 ± 232 µU/ml x min., nach dem kalten Bad 802,8 ± 111 µU/ml x min. Diese Flächen unterscheiden sich signifikant vom Kontrollkollektiv im gepaarten t-Test (Tab. 2).

Die prozentuale biologische Verfügbarkeit von exogenem Insulin kann durch das warme Bad um 70% innerhalb der ersten 90 Minuten nach der Insulin-Injektion gesteigert werden, während das kalte Bad zu einer Reduktion um 40% gegenüber der Kontrollgruppe bei Raumtemperatur führt (Abb. 16).

Ein Wechsel der Injektionsstelle vom Oberschenkel zum Oberarm im warmen Sitzbad (n= 3) führt ebenfalls zu einer Steigerung der Insulin-Absorption (Abb. 17). IRI-Conc.$_{max.}$ 28,66 ± 3,20 µU/ml und IRI-$T_{max.}$ 38.oo ± 5,91 min., die Fläche unter der Insulin-Kurve beträgt 2238 ± 273 µU/ml x min., Zeit und Fläche unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe (n= 3) nach subkutaner Injektion von Insulin in den Oberarm bei Raumtemperatur IRI-Conc.$_{max.}$ 23,50 ± 2,19 µU/ml, IRI-$T_{max.}$ 74,70 ± 9,10 min. AUC 1508 ± 95 µU/ml x min. Die prozentuale biologische Verfügbarkeit wird innerhalb der ersten 90 Minuten um 48% gesteigert.

	IRI CONC. MAX. (uU/ml)	$T_{MAX.}$ (min.)	AUC (0-90 min.) (uU/ml x min.)
Thigh Injection Room Temperature (controls n = 25)	22,24 ± 1,23	91,6 ± 10,9	1295 ± 133
Thigh Injection Cold bath (n = 6)	19,17 ± 3,02	135,0 ± 16,1*	802,8 ± 111*
Thigh Injection Hot bath (n = 6)	32,67 ± 4,33*	30,0 ± 3,7*	2201,4 ± 232*

Tab. 2: Effekte der Umgebungstemperatur auf die pharmakokinetischen Parameter IRI-Conc.$_{max.}$, $T_{max.}$ und AUC nach subcutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in den Oberschenkel. Mittelwerte ± SEM, * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test zur Kontrollgruppe.

Unterschiede im Blutzuckerverlauf waren trotz der bedeutenden Änderungen in der Serum-Insulin-Konzentration bei den einzelnen Versuchsgruppen nicht nachweisbar.

Während durch ein warmes Wasserbad die Absorption von Insulin aus dem subkutanen Depot im Oberschenkel

Abb. 16: Änderungen der prozentualen biologischen Verfügbarkeit von subkutan injiziertem Insulin durch Variation der Umgebungstemperatur und Massage des Injektionsortes. Abweichungen von der Kontrollgruppe (nach Oberschenkel-Injektion bei Raumtemperatur n= 25), die mit 100% angenommen wurde (----- Linie) sind als Δ % dargestellt.
* $p < 0,05$, signifikant different zur Kontrollgruppe im gepaarten t-Test.

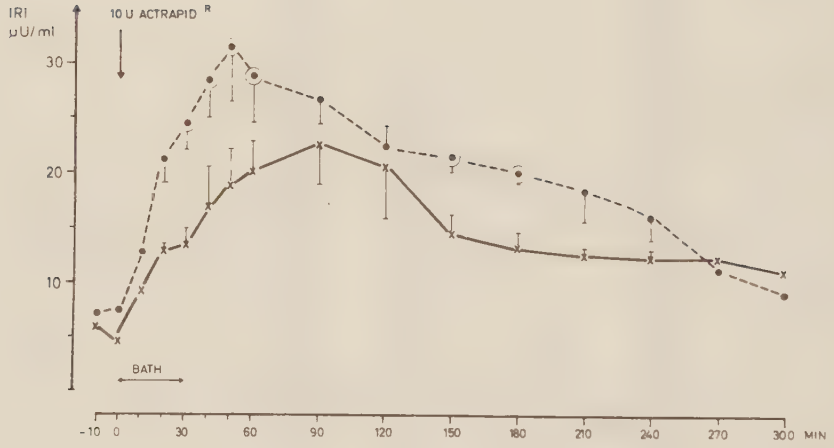

Abb. 17: Effekte eines warmen Sitzbades (42° C) auf die Insulin-Absorption nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^{R} in den Oberarm ----- (n= 3), Kontrollgruppe ——— (n= 3), nach Insulin-Injektion in den Oberarm bei Raumtemperatur. Mittelwerte ± SEM ⊙ $p < 0,05$, signifikant unterschiedlich zur Oberarm-Kontrollgruppe bei Raumtemperatur.

gesteigert werden konnte, zeigen sich im Verlauf der Serum-Insulin-Spiegel nach einem Saunabad von 30 Minuten bei einer Raumtemperatur von 85° C keine signifikanten

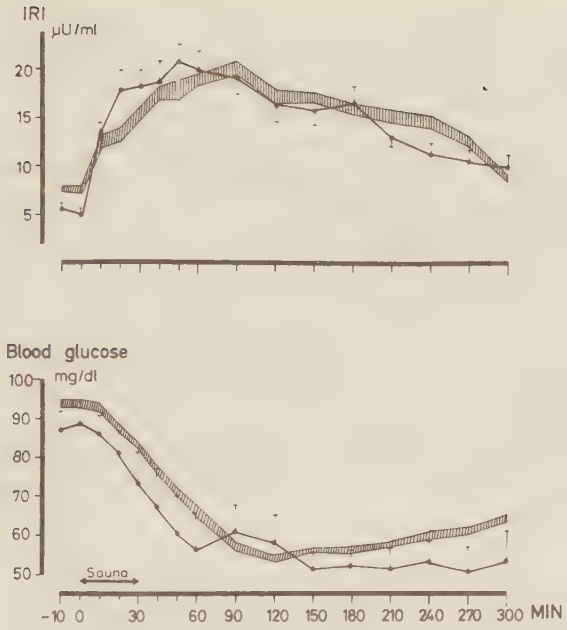

Abb. 18: obere Bildhälfte: Effekte eines Saunabades (85° C) für 30 Minuten nach der Insulin-Applikation auf den Serum-Insulin-Spiegel (n= 5), die schraffierte Fläche zeigt die Kontrollgruppe (n= 25) bei Raumtemperatur. Die untere Bildhälfte zeigt die entsprechenden Blutglukosespiegel, gleiche Symbolik wie oben.
Mittelwerte ± SEM.

Unterschiede in der Absorptionskinetik subkutan injizierten Insulins (Abb. 18).

Nicht nur eine systematische Temperaturänderung durch

ein Wasserbad beeinflusst die Insulin-Absorption, sondern auch die Auflage einer 60° C warmen Wärmeflasche auf die subkutane Injektionsstelle führt zu einer Steigerung der Absorptionsrate des exogenen Insulins (Abb. 19). Die Serum-Insulin-Spiegel unterscheiden sich zwischen der 20. und 30. Minute signifikant von der Kontrollgruppe. Die maximale Serum-Insulin-Konzentration liegt bei 24,75 ± 2,41 µU/ml und wird nach 46,70 ± 9,90 Minuten erreicht. IRI-$T_{max.}$ unterscheidet sich signifikant zur Kontrollgruppe. Die Fläche unter der Insulin-Zeitkurve innerhalb der ersten 90 Minuten beträgt 1741 ± 137 µU/ml und ist damit signifikant grösser gegenüber der Kontrollgruppe (Tab. 3). Die prozentuale biologische Verfügbarkeit wird um 30% innerhalb der ersten 90 Minuten gesteigert (Abb. 16).

Nicht nur durch eine Temperaturvariation lässt sich die Absorptionskinetik von subkutan injiziertem Alt-Insulin ändern, sondern auch durch Massage der Injektionsstelle (Abb. 19). Der Serum-Insulin-Anstieg ist beschleunigt und erhöht. Nach 10 Minuten steigt die Serum-Insulin-Konzentration bereits auf 18 µU/ml und liegt nach 40 Minuten bei 32 µU/ml, IRI-$Conc._{max.}$ beträgt 33,25 ± 4,07 µU/ml und IRI-$T_{max.}$ 37,60 ± 2,10 Minuten. Beide Parameter unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Die Berechnung der Fläche ergibt 2145 ± 339 µU/ml x min. innerhalb der ersten 90 Minuten (Tab. 3). Der Unterschied ist signifikant zur Kontrollgruppe. Die prozentuale Bioverfügbarkeit von Insulin wird um 70% gesteigert (Abb. 16).
Die erhöhte Insulin-Absorption durch Massage der Injektionsstelle oder durch lokale Wärme-Applikation

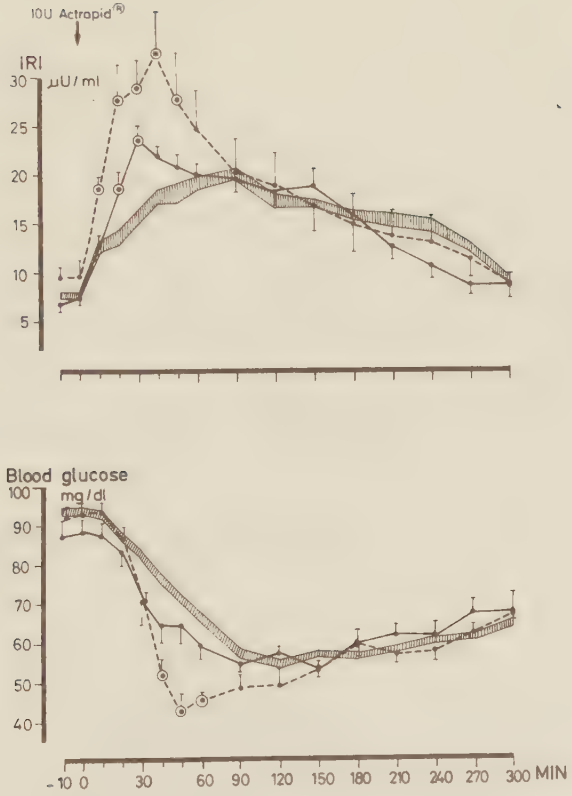

Abb. 19: obere Bildhälfte: Effekte von lokaler Wärme und Massage der Injektionsstelle auf die Insulin-Absorption: schraffierte Fläche Kontrollgruppe (n= 25) ——— Serum-Insulin-Spiegel nach Auflage einer 60° C warmen Wärmeflasche auf das s.c. Insulindepot unmittelbar nach der Insulin-Applikation für 30 Minuten (n= 6), ----- Serum-Insulin-Konzentration nach Massage der Injektionsstelle über 30 Minuten nach der Insulin-Injektion (n= 4).
Die untere Bildhälfte zeigt die Effekte der unterschiedlichen Serum-Insulin-Konzentrationen auf den Blutzucker. Symbolik wie oben.
Mittelwerte ± SEM. ⊙ $p < 0,05$ im gepaarten t-Test zur Kontrollgruppe.

	IRI CONC. MAX. (uU/ML)	$T_{MAX.}$ (MIN.)	AUC (0-90 MIN.) (uU/ML x MIN.)
THIGH INJECTION (CONTROLS, N = 25)	22,24 ± 1,23	91,6 ± 10,9	1295 ± 133
THIGH INJECTION HOT WATER BOTTLE OF INJECTION SITE (N = 6)	24,75 ± 2,41	46,7 ± 9,9*	1741 ± 137*
THIGH INJECTION RUBBING OF INJECTION SITE (N = 4)	33,25 ± 4,07*	37,6 ± 2,1*	2145 ± 339*

Tab. 3: Effekte von lokaler Wärme und Massage der Injektionsstelle auf die pharmakokinetischen Parameter: IRI-Conc.$_{max.}$, IRI-$T_{max.}$ und AUC. Mittelwerte ± SEM.
* $p < 0,005$ im gepaarten t-Test zur Kontrollgruppe.

führt zu einem steileren und tieferen Blutzuckerabfall. Signifikant niedrigere Blutglukose-Spiegel werden zwischen der 40. und 50. Minute gemessen (Abb. 19).

III, 3. Diskussion:

Lokale oder systematische Änderungen der Umgebungstemperatur können die Absorptionsrate von subkutan injiziertem Alt-Insulin entscheidend steigern. Eine massive Beschleunigung erfährt die Insulin-Absorption durch eine Erhöhung der Hauttemperatur infolge eines 42° C warmen Wasserbades oder durch die Auflage einer Wärmeflasche auf die Injektionsstelle für 30 Minuten unmittelbar nach der Insulin-Applikation. Ein kaltes Bad (22° C) führt dagegen zu einer deutlichen Verlangsamung und Verminderung der Absorption von Alt-Insulin aus dem subkutanen Gewebe. Physiologische Gründe dieser Variation in der Absorptionskinetik sind wahrscheinlich Änderungen der Hautdurchblutung zur Regulation der Körpertemperatur, denn Temperatursteigerungen führen generell zu einer Mehrdurchblutung der Haut als Vorbedingung einer gesteigerten Wärmeabgabe durch Wärmeleitung, Wärmestrahlung und Verdunstung, Abkühlung zu einer peripheren Minderdurchblutung (ASCHOFF, 1958). Diese Reaktionen sind durch Mechanismen auf mehreren Stufen peripherer und zentraler Steuerung gesichert: die glatte Muskulatur peripherer Gefässe reagiert auf Erwärmung mit Dilatation und auf Abkühlung mit Konstriktion. Lokale Erwärmung oder Abkühlung löst auf dem Wege spinaler Reflexe an deren Hautregionen gleichgesinnte Durchblutungsreaktionen hervor - sog. konsensuelle Reaktionen - (GAUER, 1972). Aufgrund dieser speziellen physiologischen Mechanismen ist die Insulin-Absorption aus dem subkutanen Oberarmdepot ebenfalls durch ein warmes Sitzbad stimulierbar. Neben der lokalen Gefässdilatation, die eine Verkürzung der Diffusionsstrecke bedingt,

ist die Zirkulationsgeschwindigkeit erhöht (KAUMFANN, 1959) und damit der Konzentrationsgradient zwischen Gewebe und Kapillarsystem. Ein weiterer Faktor, der entscheidend zur Steigerung der Absorption beitragen kann, ist der Einstrom von interstitieller Flüssigkeit besonders innerhalb der ersten 30 Minuten nach Temperatursteigerung in die Blutbahn. Das Blutvolumen kann während dieser Phase um 5% ansteigen (BALLARD, 1974). Entgegengesetzte Regulationsmechanismen treten bei Kälteexposition auf: Vasokonstriktion mit Verlängerung der Diffusionsstrecke und Abnahme des Blutvolumens bis zu 7% (BALLARD, 1974). Hämodynamische Veränderungen durch Abkühlung wurden bereits in der Therapie genutzt (TRUMPER, 1946; GILBERT, 1949), um die Absorptionsgeschwindigkeit intramuskulär injizierten Penicillins zu senken.

Änderungen der Insulin-Absorption durch Temperaturmodifikation sind bisher nur mit der indirekten Methode von BINDER (1969), KÖLENDORF (1979) und KOIVISTO (1980) gemessen worden. BINDER fand nach der subkutanen Injektion von J^{131}-Insulin keine Änderung der radioaktiven Abklingquote durch Temperatur-Modifikation, KÖLENDORF (1979) eine höhere Abklingquote in Abhängigkeit von lokalen Temperatureinflüssen infolge Durchblutungssteigerungen. Die Untersuchungsergebnisse von KOIVISTO (1980) über eine Steigerung der Absorption von subkutanem J^{125}-Insulin durch ein heisses Saunabad stehen im Widerspruch zu unseren Daten. Diese widersprüchlichen Befunde lassen sich einmal durch methodische Unterschiede erklären. KOIVISTO führte seine Untersuchungen mit der indirekten Methode nach BINDER durch; wir aber bestimmten als Mass der Absorption von

exogenem Insulin aus dem subkutanen Depot die aktuelle Serum-Insulin-Konzentration. Physiologische Ursachen, die trotz Steigerung der Umgebungstemperatur nicht zur Erhöhung der Absorptionsrate von exogenem Insulin aus dem subkutanen Injektionsdepot führen, können spezifische Mechanismen in der Temperaturregulation beim Saunabad sein.
Die Körpertemperatur wird hier vornehmlich über eine gesteigerte Schweissproduktion reguliert, dabei kommt es zu einer vermehrten Bradykininbildung im Gewebe (FOX & HILTON, 1958; LOVE & SHANKS, 1962). Das Spektrum der Wirkungen des Bradykinins ähnelt demjenigen des Histamins, das zu einer Verzögerung der Absorption von Substanzen aus subkutanen Depots führt (SCHOU, 1961). Der geringere postprandiale Blutzuckeranstieg während und nach dem Saunabad bei den Untersuchungen von KOIVISTO kann man auf eine verzögerte Magenentleerung und Resorption durch die Temperatursteigerung erklären (BALLARD, 1974).
Die mechanische Reizung der subkutanen Injektionsstelle durch Massage führt zu einer besonders intensiven Verstärkung der Absorption von subkutan injiziertem Insulin, wahrscheinlich einmal über eine lokale Hyperämie zum anderen wird durch die Massage das Insulindepot im Gewebe verbreitert und damit für die Absorption zur Verfügung stehende Oberfläche wesentlich vergrössert. Auch diese nachhaltige Verstärkung der Bioverfügbarkeit von Insulin kann wie der verstärkte Blutzuckerabfall zeigt, evtl. therapeutisch genutzt werden.

IV Veränderungen der Insulin-Absorption durch Muskelarbeit:

Muskelarbeit gilt seit jeher als wichtiger Bestandteil in der Diabetes-Therapie. Bereits im 6. Jahrhundert v. Christi hat der indische Arzt Sushruta (VRANIC, 1979) bei bestimmten Formen des Diabetes mellitus körperliche Aktivität empfohlen. Vor 100 Jahren wies BOUCHARDAT (1865) auf den therapeutischen Nutzeffekt von körperlicher Betätigung hin. Nach der Entdeckung des Insulins waren es besonders KATSCH (1939) und JOSLIN (1939), die die therapeutische Bedeutung der Muskelarbeit bei Diabetes mellitus hervorgehoben haben.

Die klinischen Beobachtungen aus früheren Jahren konnten in letzter Zeit durch experimentelle Untersuchungen bestätigt und erweitert werden. Aus der Vielzahl der Stoffwechselwirkungen der Muskelarbeit ist für den Patienten mit Diabetes mellitus die Erhöhung des Glukoseverbrauchs unter Muskelkontraktionen von besonderer Bedeutung. Seit den Untersuchungen von LAWRENCE (1926), BÜRGER und KRAMER (1928) in den zwanziger Jahren ist bekannt, dass Muskelarbeit die hypoglykämische Wirkung subkutan injizierten Insulins verstärken kann und es so unter oder nach körperlicher Belastung bei insulinbehandelten Patienten zum Auftreten von Hypoglykämien kommen kann. Diese Gefahr hat z.B. dazu geführt, dass auch heute noch ein Grossteil der diabetischen Kinder von der sportlichen Betätigung (Schulsport) ausgeschlossen werden. Als eine mögliche Ursache des erhöhten Glukoseumsatzes wird eine Steigerung der subkutanen Insulin-Absorption durch Muskelarbeit angenommen (KAWARINO, 1977; BERGER, 1978; DANDONNA,

1978; KOIVISTO, 1978, VRANIC, 1979). Ausgehend von diesen Untersuchungsergebnissen empfehlen KOIVISTO und FELIG (1978) zur Vermeidung einer Hypoglykämie einen Wechsel der subkutanen Insulin-Injektion in einen Körperteil, der nicht unmittelbar an der Muskelarbeit beteiligt ist; z.B. in die Bauch- oder Armregion beim Fahrradfahren. Da in den bisher vorliegenden Studien die Muskelarbeit unmittelbar nach der Insulin-Injektion nüchtern begonnen wurde (BERGER, 1978; DANDONNA, 1978) oder unmittelbar nach einer Mahlzeit und Insulin-Applikation, also Versuchsbedingungen, die nicht annähernd den täglichen Lebensgewohnheiten eines Diabetikers entsprechen, haben wir unseren Versuchsansatz zur Frage der Variation der Insulin-Absorption durch Muskelarbeit so gewählt, dass er den alltäglichen Gewohnheiten der Patienten eher entspricht.

IV, 1. Versuchsablauf:

Untersucht wurden 4 insulinpflichtige Patienten - eine Frau und drei Männer - im Alter zwischen 30 und 48 Jahren und als Kontrollgruppe 4 gesunde, normgewichtige, männliche Versuchspersonen im Alter zwischen 20 und 36 Jahren. Die 4 Patienten hatten einen frisch entdeckten Diabetes mellitus vom juvenilen Typ ohne Insulinantikörper. Alle Patienten befanden sich in einer kompensierten Stoffwechsellage, Gewichtskonstanz und waren frei von akuten oder chronischen Infekten. Diabetische Spätkomplikationen bestanden nicht. Laborchemische und elektrocardiographische Untersuchungen zeigten eine normale Funktion von Leber, Herz und Nieren. Alle Patienten mit Diabetes mellitus waren mit langwirken-

den Insulinen eingestellt. Mit Ausnahme eines Patienten (Patient A), der nur einmal morgens Insulin spritzte, applizierten alle übrigen Patienten eine Morgen- und Abenddosis. Der Nüchternblutzucker lag im Mittel bei 165 mg/dl ± 25.

Um 7.3o Uhr erhielten die Patienten ihre übliche Insulin-Injektion, wobei die Dosis um 20 E reduziert wurde. Der Patient A, der nur einmal morgens Insulin applizierte erhielt nur 12 E Insulin weniger.Um 8.oo Uhr erhielten die Patienten ihr Frühstück.
Die Zusammensetzung des Frühstücks wurde nicht geändert, der Kohlenhydratanteil lag bei 25 - 50 g. Eine halbe Stunde vor der Fahrrad-Ergometerbelastung ruhten die Probanden in liegender Position. Während dieser Zeit wurde über einen Teflonkatheter ein venöser Zugang in der Ellenbeuge gelegt und mit einer physiologischen NaCl-Lösung für die Blutentnahmen offen gehalten. Um 9.oo Uhr wurden 20 E Actrapid^{R}- bei Patient A nur 12 E - subkutan in den Oberarm oder in den Oberschenkel injiziert. Die Reihenfolge der einzelnen Versuche: Ruhe, Muskelarbeit, Insulin-Injektion in den Oberarm oder Oberschenkel war durch eine Randomisierungsliste festgelegt worden. Die Arbeitsbelastung wurde nach der Herzfrequenz, die kontinuierlich über einen Monitor registriert wurde, ausgerichtet. Über den gesamten Belastungszeitraum wurde eine mittlere Herzfrequenz von 125 ± 5 erreicht, die einer Belastung von etwa 90 ± 10 Watt entsprach. Die Fahrrad-Ergometer-Belastung wurde 35 Minuten nach der Alt-Insulin-Injektion gestartet. In Perioden von jeweils 10 Minuten, unterbrochen von 5 Minuten Pause zur Blutentnahme. Nach der Belastung erfolgte eine 45-minütige Erholungsphase im Liegen.

Die gesunde Kontrollgruppe nahm um 8.oo Uhr das übliche Frühstück ein, erhielt kein Insulin; die Arbeitsbelastung entsprach die der Patienten mit Diabetes mellitus.

IV, 2. Ergebnisse:

Bei der Bestimmung der Serum-Insulin-Spiegel bei vier Patienten ohne Insulinantikörper (Abb. 20) fallen die bereits vor der Alt-Insulin-Injektion gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöhten Insulin-Spiegel auf. Wahrscheinlich bedingt durch die Applikation des langwirkenden Insulins am Morgen des Versuchstages oder noch als Rest der Abenddosis. Nach der Alt-Insulin-Injektion kommt es zu einem weiteren Anstieg der Serum-Insulin-Konzentration unabhängig vom Injektionsort und der Muskelarbeit. Ein signifikant höherer Serum-Insulin-Spiegel gegenüber dem Ruheversuch war nur 15 Minuten nach Abschluss der Fahrrad-Ergometerbelastung nach subkutaner Insulin-Injektion in den Oberschenkel nachweisbar. Bei der gesunden Kontrollgruppe lag der Serum-Insulin-Spiegel nicht nur zu Beginn der Muskelarbeit niedriger sondern sinkt auch noch unter der Belastung weiter ab.

Bei den Patienten mit Diabetes mellitus sinkt der Blutglukosespiegel in Ruhe kontinuierlich ab, wobei nach Oberarm-Injektion bereits nach 75 Minuten der Unterschied zum Basalwert signifikant wird,nach subkutaner Insulin-Injektion in den Oberschenkel erst nach 90 Minuten (Abb. 21).

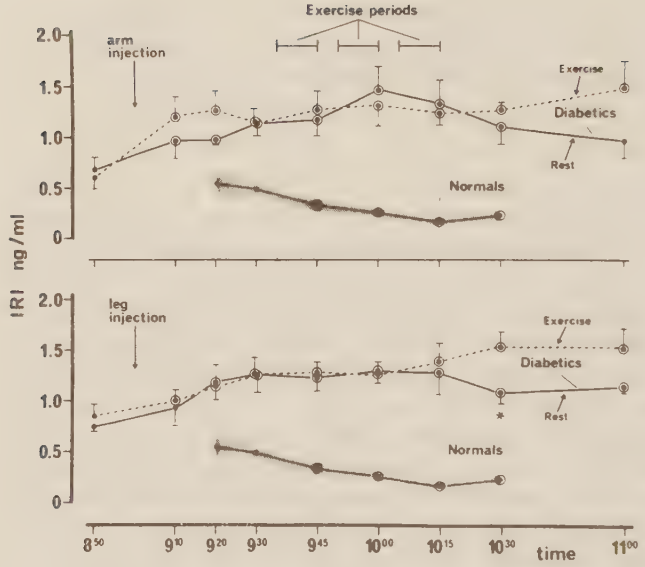

Abb. 20: Einfluss einer Fahrrad-Ergometerbelastung von 90 ± 10 Watt auf die Serum-Insulin-Konzentration bei Normalpersonen (n= 4) und Patienten mit juvenilem Typ Diabetes (n= 4). Mittelwerte ± SEM.

Bereits 10 Minuten nach der Ergometerbelastung ist der Blutzucker gegenüber dem Ausgangswert signifikant abgefallen unabhängig von der Insulin-Injektionsstelle. Während der weiteren Arbeitsphase sinkt der Blutglukose-Spiegel massiv ab. Bei der gesunden Kontrollgruppe kommt es nur in der ersten Phase der Muskelarbeit zu einem geringgradigen Blutzuckerabfall,

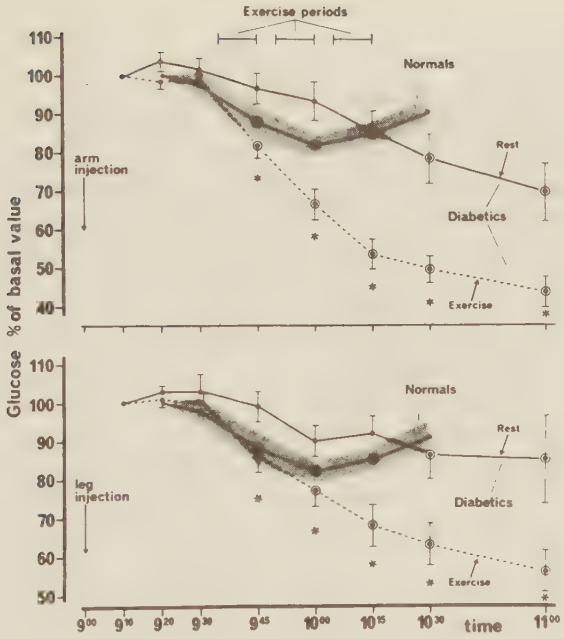

Abb. 21: Effekte von Muskelarbeit auf die Blutglukose-Konzentration bei Normalpersonen und Patienten mit juvenilem Typ Diabetes. Versuchsablauf und Symbolik wie Abb. 20. Die Änderung des Blutzuckers ist prozentual zum Ausgangswert (100%) dargestellt. * $p < 0.05$ signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert.

in den letzten 10 Minuten der Belastung und während der Erholungsphase steigt der Blutglukosespiegel wieder an. Der Blutzuckerabfall der Patienten mit Diabetes mellitus setzt sich dagegen auch in der Erholungsphase fort.

IV, 3. Diskussion:

Eine gesteigerte Absorption von exogenem Insulin in den Kreislauf wird als ursächlicher Mechanismus für die Hypoglykämie unter/nach Muskelarbeit bei Patienten mit juvenilem Typ Diabetes (ZINMAN, 1977; KOIVISTO, 1978) oder in Tierversuchen (KAWAMORI, 1977; BERGER, 1978) diskutiert. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde von KOIVISTO und FELIG (1978) empfohlen, zur Vermeidung einer Arbeitshypoglykämie bei insulinbehandelten Diabetikern die Insulin-Injektionsstelle an Körperregionen zu verlegen, die nicht oder nur wenig an den Bewegungen teilnehmen, z.B. vor dem Fahrradfahren einen Wechsel der Injektionsstelle vom Oberschenkel zur Bauchregion. Unsere Untersuchungen haben - in Übereinstimmung mit der klinischen Praxis - diese weltweit propagierte Empfehlung für Diabetiker nicht bestätigt.

Muskelarbeit verstärkt den hypoglykämischen Effekt von exogenem Insulin, ohne dass eine gesteigerte Mobilisation von Insulin aus dem subkutanen Injektionsdepot vorliegt. Im Gegenteil führt eine Muskelarbeit (Fahrradfahren) ca. 40 Minuten nach der subkutanen Injektion von Alt-Insulin zu einer massiven Verstärkung der hypoglykämischen Wirkung des Hormons unabhängig davon, ob das Insulin in das Bein oder in den Arm injiziert wurde. Unsere pharmakokinetischen Untersuchungen haben bewiesen, dass unter diesen Versuchsbedingungen - Muskelarbeit mindestens 30 Minuten nach der Alt-Insulin-Injektion - , die ohnehin dem praktischen Tagesablauf eher entspricht als körperliche Belastung unmittelbar nach der Insulin-Injektion, keine Steigerung der Insulin-Absorption ausgelöst wird. Dieser Befund steht

im direkten Einklang mit der im Tierexperiment erarbeiteten Absorptionskinetik von subkutan injiziertem Insulin: Diesen direkten Messungen zufolge beträgt die T_{50}, d.h. die Zeit nach der die Hälfte des injizierten Insulins von der Injektionsstelle absorbiert ist ca. 35 Minuten (BERGER, 1979). Biologisch effektive Veränderungen der Absorptionskinetik von subkutan injiziertem Alt-Insulin können daher nach Ablauf von 30 Minuten kaum noch erwartet werden. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen vielmehr, dass die iatrogene konstante Hyperinsulinämie des Diabetikers, die die physiologische Senkung des Insulin-Spiegels unter Muskelarbeit verhindert, die Ursache für die Arbeitshypoglykämie insulinbehandelter Diabetiker darstellt. Adäquate Präventionsmassnahmen können, wie kürzlich propagiert (KOIVISTO, 1978), nicht in einem Wechsel der Injektionstelle bestehen, sondern sie müssen auf einer zusätzlichen Aufnahme von Kohlenhydraten - besonders bei kurzen körperlichen Belastungen - und/oder einer Reduktion der Insulindosis - besonders vor Ausdauer-Belastungen - beruhen. Dabei konnten wir kürzlich nachweisen, dass es zur Durchführung einer dreistündigen milden Fahrrad-Ergometerbelastung (90 - 100 Watt) im Laufe eines Vormittages einer drastischen Reduktion der morgendlichen Insulindosis auf 20% des langwirkenden Insulins und einer vollständigen Elimination des morgendlichen Alt-Insulin-Anteils bedarf, um eine Hypoglykämie zu vermeiden.

V Veränderungen der Insulin-Absorption durch Inhibition der Insulin-Degradation in der Subcutis:

BERGER (1979) berichtete vor kurzem, dass eine bedeutende Menge exogenen Alt-Insulins im subkutanen Fettgewebe der Injektionsstelle enzymatisch degradiert wird, bevor es überhaupt in das Zirkulationssystem gelangt. OFFORD (1979) konnte nachweisen, dass sich dieser enzymatische Prozess durch verschiedene Substanzen spezifisch hemmen lässt. Von diesen untersuchten Substanzen schien sich das Aprotinin besonders für eine klinisch-experimentelle Prüfung zu eignen. Aprotinin ist ein Polypeptid, das aus tierischem Gewebe extrahiert wird, mit polyvalenter Proteinasehemmwirkung. Wir verwendeten bei unseren Untersuchungen ein Aprotininpräparat (TRASYLOL^{R}) der Firma Bayer, Leverkusen, das in 5 ml 14 mg Polypeptid - entsprechend 100.000 EKIE (KALLIKREIN-INAKTIVATOR EINHEITEN) - enthält und aus Rinderlunge gewonnen wird.

V, 1. Untersuchungsverlauf:

An der Untersuchung nahmen 8 gesunde, männliche, normgewichtige Versuchspersonen im Alter von 20 bis 25 Jahren teil. Nach einer vorher festgelegten Randomisierungsliste erhielten die Probanden entweder 10.000 KIE Trasylol^{R} und 10 E Actrapid^{R}, die unmittelbar vor der subkutanen Injektion in die Vorderseite des Oberschenkels miteinander gemischt wurden, oder 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung 10 E Actrapid^{R}. Zur Abklärung der Aprotinin Wirkung erhielten in einem weiteren Versuch 4 Probanden im Wechsel 0,5 ml Aprotinin-Lösungsvermittler (Benzylalkohol) plus 10 E Actrapid^{R} oder 0,5 ml

Eigenserum plus 10 E Actrapid^{R}. Zusätzlich wurde die Wirkung von 10.000 E Trasylol^{R} ohne Insulin auf den Serum-Insulin- und Blutglukose-Spiegel geprüft. Sämtliche Untersuchungen wurden nach einer Nahrungskarenz von 8 - 12 Stunden morgens nüchtern durchgeführt. Die Blutentnahmen zur Bestimmung von Insulin, C-Peptid und Glukose erfolgten über eine Cubitalvene bis 120 Minuten nach der Insulin-Injektion.

V, 2. Ergebnisse:

Abb. 22 zeigt die Wirkung von Aprotinin auf die Serum-Insulin-Konzentration, wenn Insulin zusammen mit 10.000 E Trasylol^{R} subkutan injiziert wird. Der Anstieg des Serum-Insulin-Spiegels ist zwischen der 15. und 45. Minute nach der Aprotinin-Insulin-Applikation signifikant beschleunigt und erhöht gegenüber der NaCl-Insulin-Kontrollgruppe. Die maximale Serum-Insulin-Konzentration IRI-Conc.$_{max.}$ liegt bei 30,30 $\pm$ 2,10 µU/ml und wird nach 46,80 $\pm$ 5,30 Minuten (IRI-$T_{max.}$) erreicht. Die entsprechenden Daten der Kontrollgruppe lauten IRI-Conc.$_{max.}$ 22,20 $\pm$ 2,30 µU/ml und IRI-$T_{max.}$ 71,20 $\pm$ 7,90 Minuten (Tab. 4).

Ein signifikant verstärkter Blutzuckerabfall durch die erhöhten Serum-Insulin-Spiegel ist zwischen der 30. und 60. Minute nach der Aprotinin-Insulin-Injektion nachweisbar. Die C-Peptid-Spiegel beider Kollektive zeigen keine signifikanten Unterschiede. Trasylol^{R} alleine subkutan injiziert ist ohne Wirkung auf Blutglukose und Serum-Insulin-Konzentration (BERGER, 1980). Die Mischung des Trasylol^{R}-Lösungsvermittlers (Abb. 23).

	IRI CONC. MAX (uU/ml)	$T_{MAX.}$ (min.)	AUC (0-120min.) (uU/ml x min.)
10 U Actrapid® + 0,5 ml phys. NaCl (N=8)	25,20 ± 2,30	71,20 ± 7,9	2199 ± 148
10 U Actrapid + 10.000 U Aprotinin (0,5 ml Trasylol®) (N=8)	30,30 ± 2,10*	46,8 ± 5,3*	2564 ± 81*

Tab. 4: Pharmakokinetische Parameter - IRI-Conc.$_{max.}$ $T_{max.}$ und AUC - nach Injektion von Insulin zusammen mit Aprotinin (n= 8) oder Insulin zusammen mit phys. NaCl-Lösung (n= 8). Mittelwerte ± SEM, * $p < 0,05$ im gepaarten t-Test zur NaCl-Insulin-Gruppe.

zeigt zur NaCl-Insulin-Gruppe keine statistisch sicher nachweisbaren Unterschiede in der Serum-Insulin-Konzentration oder im Verlauf der Blutglukose-Spiegel. Die Kombination Eigenserum und Insulin führt zu einem deutlichen Anstieg der Serum-Insulin-Konzentration ähnlich

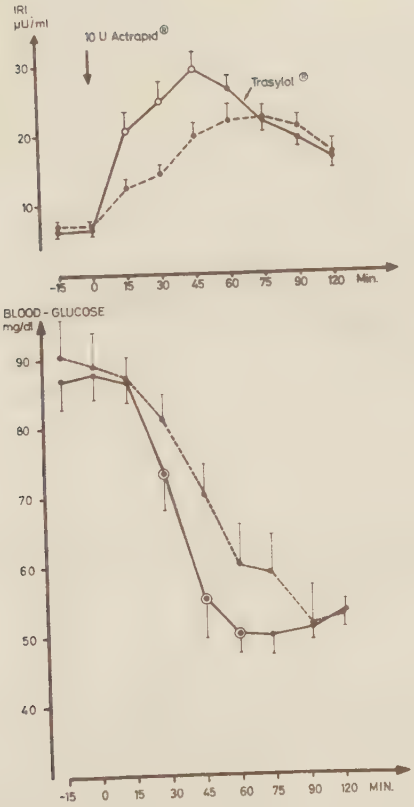

Abb. 22: obere Bildhälfte: Effekte von Aprotinin (Trasylol^R) auf die Serum-Insulin-Konzentration nach subkutaner Injektion von 10 E Actrapid^R zusammen mit 0,5 ml Aprotinin (———) entsprechend 10.000 KIU, n= 8). In der Kontrollgruppe (n= 8) wurden zum Volumenausgleich 0,5 ml phys. NaCl-Lösung zusammen mit 10 E Actrapid^R ----- subkutan in den Oberschenkel injiziert. untere Bildhälfte: Änderungen der Blutglukose-Konzentration, Symbolik wie oben, Mittelwerte ± SEM ◯ ◉ $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zur NaCl-Insulin-Kontrolle.

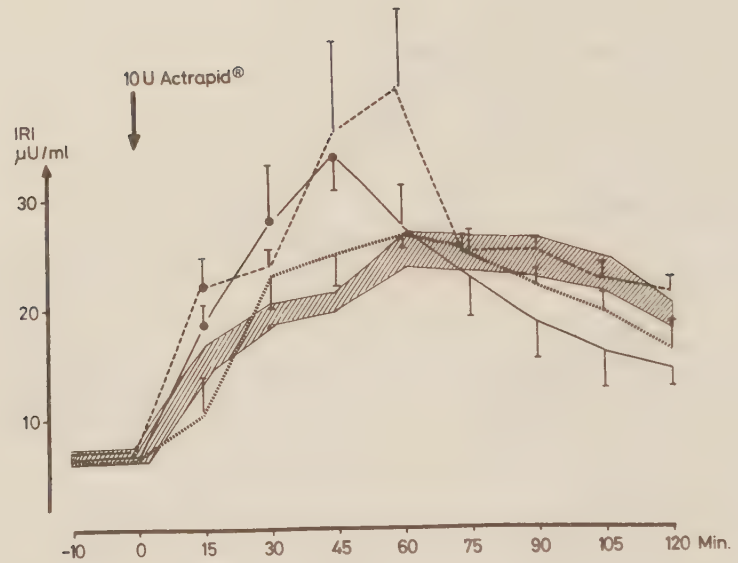

Abb. 23: Effekte von 0,5 ml Eigenserum ----- (n= 4) 0,5 ml Trasylol ——— (n= 4), 0,5 ml Trasylol-Lösungsvermittler ····· (n= 4), und 0,5 ml phys. NaCl-Lösung schraffierte Fläche (n= 4) jeweils zusammen mit 10 E Actrapid^{R} injiziert auf die Serum-Insulin-Konzentration. Mittelwerte ± SEM, ● $p < 0,05$ statistisch signifikanter Unterschied zur NaCl-Actrapid^{R}-Gruppe.

dem Aprotinin-Insulin-Gemisch gegenüber der NaCl-Insulin Kontrollgruppe besonders nach 60 Minuten; dieser Unterschied ist jedoch nur 15 Minuten p.i. statistisch zu sichern. Unterschiede im Blutzuckerverlauf waren hier nicht statistisch signifikant nachweisbar.

V, 3. Diskussion:

Durch Zusatz von Aprotinin (TRASYLOL^{R}) zu Alt-Insulin wird die Insulin-Absorption nach subkutaner Injektion beschleunigt und der hypoglykämische Effekt bei Normalpersonen verstärkt (BERGER, 1980). In weiteren Studien haben wir versucht, den Mechanismus dieser Wirkung des Aprotinins näher zu charakterisieren. So konnten wir sukzessive ausschliessen, dass es sich bei der Verstärkung der Insulin-Absorption und - Wirkung durch den Zusatz von Aprotinin zu Actrapid^{R} - Insulin a) um eine Aprotinin-Wirkung auf die endogene Insulinsekretion handelt, b) dass der Effekt auf einer Wirkung des Lösungsmittels für Aprotinin (Benzylalkohol) beruht und c) dass die Steigerung der Insulin-Absorption durch die Vergrösserung des Injektionsvolumens zustande kommt. Das von uns erstmals beschriebene Phänomen der Steigerung der Absorption subkutan injizierten Alt-Insulins durch Aprotinin (BERGER, 1980) kann darüber hinaus prinzipiell auf verschiedenen Wirkmechanismen beruhen: 1) Aprotinin könnte eine Carrierfunktion für das Insulinmolekül auf dem Wege vom subkutanen Insulindepot in die Blutbahn übernehmen. In diesem Zusammenhang gewinnt eine Beobachtung von BERTRAM (1925) an Bedeutung, der zufolge der hypoglykämische Effekt von subkutan injiziertem Alt-Insulin durch Zusatz von Eigenserum des Patienten gesteigert werden konnte. Wir haben in der Tat bestätigen können, dass durch Zusatz von 0,5 ml Eigenserum zu 10 E Actrapid^{R}-Lösung die Insulinabsorption substantiell gesteigert wird (Abb. 23). Es ist denkbar, dass die Effekte des Serum-Albumins wie des Polypeptidmoleküls Aprotinin durch eine Beschleunigung des transkapillären Insulintransports zustande kommen. Weitere Untersuchungen sind allerdings erforderlich, um diese

rein spekulative Hypothese experimentell zu stützen. 2) Aprotinin könnte durch Veränderungen der Mikrozirkulation eine Steigerung der Insulin-Absorption bewirken. Auch hierzu liegen derzeit keine experimentellen Daten vor. 3) Weit wahrscheinlicher stellt sich die Hypothese dar, der zufolge die Insulindegradation an der Injektionstelle durch Aprotinin gehemmt wird und dadurch eine Beschleunigung und eine Steigerung der Insulinabsorption ausgelöst wird. Diese These, die in Übereinsteimmung mit experimentellen in vitro Untersuchungen steht (BERGER, 1978; 1979; 1980) bedarf allerdings noch der Absicherung durch entsprechende Studien in vivo.

Während der Mechanismus des positiven Aprotinin-Effektes noch nicht endgültig geklärt ist, konnte das Phänomen schon erfolgreich therapeutisch genutzt werden. PAULSEN et al. (1979) haben ein Krankheitsbild beschrieben, bei dem es bei Diabetikern zu einer massiven, lebensbedrohlichen Resistenz gegen subkutan applizierten Insulins kommt, während der Organismus gegenüber intravenös verabreichtem Insulin relativ sensitiv bleibt. Es ist anzunehmen, dass dieses Phänomen durch eine exzessive Degradation des exogenen Insulins an der subkutanen Injektionsstelle hervorgerufen wird. Wir haben daher in Zusammenarbeit mit einer Schweizer Arbeitsgruppe eine Patientin mit einem derartigen Krankheitsbild mit dem Zusatz von Trasylol^{R} zu dem subkutan applizierten Insulin behandelt (MÜLLER, 1980): Dieser Therapieversuch erwies sich als ausserordentlich erfolgreich, denn die Insulindosis konnte unter einer erheblichen Verbesserung der Stoffwechsellage auf etwa 10% gesenkt werden. Auslassversuche bestätigten

die Spezifität des Trasylol^{R}-Effektes dieser Behandlung. Darüber hinaus konnte unter Verwendung von tritiiertem Insulin nachgewiesen werden, dass die bei dieser Patientin initial eingeschränkte Insulin-Absorption durch Aprotinin normalisiert werden konnte. Inzwischen sind weitere positive Erfahrungen mit der Trasylol^{R}-Insulin-Therapie bei einer Vielzahl von Patienten mit einer Resistenz gegen subkutan applizierten Insulins mitgeteilt worden (FREIDENBERG, 1980; GUNNARSON, 1980). Demnach scheint die gemeinsame Injektion von Insulin und Trasylol^{R} bestimmte Störungen der Insulin-Absorption zu verhindern - möglicherweise - über eine Hemmung exzessiver Insulindegradation an der Injektionsstelle. Weitergehende, allgemeine Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens zur Beschleunigung der Insulinabsorption bei juvenilem Diabetes werden derzeit geprüft. Dabei sollten auch andere, möglicherweise noch wirksamere und spezifischere Substanzen zur Hemmung der Insulindegradation (OFFORD, 1979) zum Einsatz kommen.

D Z U S A M M E N F A S S U N G

Diese Studie stellt eine systematische klinisch-experimentelle Erarbeitung der Absorptionskinetik und der Bioverfügbarkeit subkutan injizierten Insulins beim Menschen dar. Nachdem in tierexperimentellen Untersuchungen erstmals die Degradation subkutan applizierten Insulins an der Injektionsstelle und eine monoexponentielle Absorptionskinetik subkutan injizierten Insulins

nachgewiesen wurde, ergab sich daraus die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer, direkter Methoden zur Messung der Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins am Menschen. Die Erarbeitung der Evaluation dieser direkten Verfahren zur Bestimmung der Insulin-Absorption aus der Subkutis werden im einzelnen beschrieben. Mit Hilfe dieser Methodik wird die Insulin-Pharmakokinetik systematisch in einer Reihe von klinischen Forschungsansätzen dargestellt und die ausserordentliche Variabilität und Steuerbarkeit der Insulin-Absorption nachgewiesen. So ergeben sich massive Veränderungen sowohl der Absorption subkutan injizierten Insulins als auch seiner biologischen Wirksamkeit durch a) Veränderungen der Injektionsstelle, b) Temperatureinflüsse, c) lokale Massage der Injektionsstelle. Diesen Phänomenen ist in der Praxis der Insulin-Therapie Rechnung zu tragen, um Stoffwechselschwankungen und -entgleisungen vorzubeugen. Andererseits ergeben sich konkrete Ansätze diese Effekte bei der Verbesserung der Insulin-Therapie z.B. im Sinne einer Beschleunigung des Wirkungseintrittes zu nutzen. Besondere klinische Bedeutung kommt der Potenzierung des hypoglykämischen Insulineffektes durch Muskelarbeit zu. Die hier vorgelegten Untersuchungen weisen nach, dass in der Pathogenese der Arbeitshypoglykämie bei insulinbehandelten Diabetikern lediglich dann eine Steigerung der Insulin-Absorption wirksam werden kann, wenn die körperliche Belastung sehr rasch nach einer Alt-Insulin-Injektion erfolgt. Aus diesem Grunde muss der kürzlich propagierte Wechsel der Insulin-Injektionsstelle als Schutzmassnahme gegen die Arbeitshypoglykämie bei insulinbehandelten Diabetikern in der Regel wirkungslos bleiben. Eine effektive Prävention bei

langdauernder Muskelarbeit ist durch eine radikale Kürzung der vorhergehenden Insulindosis zu erreichen. Bei kurzwirkender Muskelarbeit scheint die Gabe von zusätzlichen Kohlenhydraten ausreichend zu sein.

Der Nachweis der lokalen Degradation exogenen Insulins an der Injektionsstelle eröffnete die theoretische Möglichkeit, die Insulin-Absorption durch eine pharmakologische Hemmung dieses Degradationsprozesses zu steigern und zu beschleunigen. In Tierversuchen konnte dieser enzymatische Insulinabbau im Fettgewebe mit Aprotinin dosisabhängig gehemmt werden. In Untersuchungen an Normalpersonen und Diabetikern konnte eine Steigerung und Beschleunigung der Insulin-Absorption durch Zusatz von Trasylol^{R} nachgewiesen werden. Der Mechanismus dieses Effektes ist noch nicht eindeutig geklärt, ein ursächlicher Zusammenhang mit der Hemmung des Insulinabbaues durch Aprotinin ist hingegen wahrscheinlich. Bei Patienten mit massiver Resistenz gegenüber subkutan injiziertem Insulin konnten unter Verwendung dieses therapeutischen Prinzips, des Zusatzes von Trasylol^{R} zum subkutan injizierten Insulin, entscheidende Erfolge erzielt werden.

Die Berücksichtigung und Ausnützung der in dieser klinisch-experimentellen Studie erarbeiteten Befunde zur Absorptionskinetik subkutan injizierten Insulins dürfte, wie in einzelnen Beispielen bereits aufgeführt, als auch in allgemeiner Hinsicht zu einer wesentlichen Verbesserung der konventionellen Insulin-Substitutionstherapie wie auch der Insulin-Therapie mit subkutaner Dauerinfusion beitragen.

L I T E R A T U R

Anonymus: Subcutaneous injections and absorption of insulin. (Lancet-Editorial). Lancet, I: 1005-1006 (1980)

Aschoff, J.: Hauttemperatur und Hautdurchblutung im Dienst der Temperaturregulation. Klin. Wschr. 36: 193-202 (1958)

Asher, L.: Ein Beitrag zur Resorption durch die Blutgefässe. Z.f. Biologie 29: 247-255 (1892)

Ballard, B.E.: Pharmacokinetics and temperature. J. Pharm. Sci. 63: 1345-1358 (1974)

Bangham, D.R.: Musset, M.V. The fourth international standard for insulin. Bull. Wld. Hlth. Org. 20: 1209 (1959)

Banting, F.G.: Best, C.H. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Canad. med. Ass. J. 12. 141-44 (1922)

Banting, F.G.: Campbell, W.R. Fletcher, A.A. Further clinical experience with insulin (pancreatic extracts), in the treatment of diabetes mellitus. Brit. med. J. 8-12 (1923)

Bennett, H.S.: Luft, J.H. Hampton, J.C. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. Am. J. Physiol. 196 (2): 381-390, (1959)

Berger, M.: Halban, P.A. Müller, W.A. Offord, R.E. Renold, A.E. Vranic, M. Mobilization of subcutaneously injected tritiated insulin in rats: effects of muscular exercise. Diabetologia 15: 133-140 (1978)

Berger, M.:
Halban, P.A.
Müller, W.A.
Offord, R.E.
Vranic, M.
Renold, A.E.
Pharmacokinetics of subcutaneously injected tritiated insulin: effect of exercise.
Diabetes 28 (Suppl. 1) 53-57 (1979)

Berger, M.:
Halban, P.A.
Girardier, L.
Seydoux, J.
Offord, R.E.
Renold, A.E.
Absorption kinetics of subcutaneously injected insulin. Evidence for degradation at the injection site.
Diabetologia, 7: 97-99 (1979)

Berger, M.:
Cüppers, H.-J.
Halban, P.A.
Offord, R.E.
The effect of aprotinin on the absorption of subcutaneously injected regular insulin in normal subjects.
Diabetes 29: 81-83 (1980)

Bertram, F.:
Über die Aktivierung des Insulins durch Eiweisskörper.
Klin. Wschr. 4: 2285-2288 (1925)

Binder, C.:
Absorption of injected insulin.
Acta Pharmacol. Toxicol. (Suppl. 2) 27: 1-87 (1969)

Bouchardat, M.:
De l'entraînement ou l'exercise forcé appliqué au traitement de la glucosurie.
Ann. thérapie de matière medical pour 1865, pp. 291 (1865)

Brownlee, M.:
Cahill, G.F.
Diabetic control and vascular complications.
Atherosclerosis Reviews 4: 29-70 (1979)

Brunner, D.:
Weisbord, J.
Meshulam, N.
Margulis, S.
Langzeitwirkung und Dauertherapie mit kutan appliziertem Isosorbiddinitrat.
Münch. med. Wschr. 122: 801-806 (1980)

Bucher, O.: Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. Med. Verl. H. Huber, Bern-Stuttgart (1962)

Bücher, T.: Czok, R. Lamprecht, N. Latzko, E.: Pyruvat. In: H.U. Bergmeyer (Ed).: Methods of enzymatic analysis 253-259, New York, London: Academic Press 1963

Bürger, M.: Kramer, H.: Über die durch Muskelarbeit hervorgerufene Steigerung der Insulinwirkung auf den Blutzuckergehalt beim normalen und gestörten Kohlenhydratstoffwechsel und ihre praktische und theoretische Bedeutung. Klin. Wschr. 7: 745-750 (1928)

Cahill, G.F.: Etzwiler, D.D.: Freinkel, N.: "Control" and diabetes. New Engl. J. Med. 294: 1004 (1976)

Dandona, P.: Hooke, D. Bell, J.: Exercise and insulin absorption from subcutaneous tissue. Br. Med. J. 1: 479-480 (1978)

Fox, R.H.: Hilton, S.M.: Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation. J. Physiol. 142: 219-232 (1958)

Freidenberg, N.: White, S. Cataland, S. O'Dorisio, T. Sotos, J. Santiago, J.: Effectiveness of aprotinin (Trasylol^{R}) in protease-mediated insulin resistance. Diabetes 29: (Suppl. 2) 23A (1980)

Gauer, O.H.: Kreislauf des Blutes. Lehrbuch des Physiologie, Bd.I, 65-186 (1960) Hrsg.: H.U. Rosemann, Verl. Urban-Schwarzenberg Berlin-München.

Gauer, O.H.: Kreislauf des Blutes. In: Herz und Kreislauf, Physiologie des Menschen Bd. III Hrsg.: Gauer-Kramer-Jung Urban-Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1972)

Gilbert, R.A.: Call, R.A. Roose, D.J. The clinical results of combined penicillin and ice therapy. Bull. Johns Hopkins Hospital 84: 245-254 (1949)

Grady, H.J.: Lamar, M.Y. Glucose determination by automated chemical analysis. Clin. Chem. 5: 542-550 (1959)

Gunnarson, R.: Arner, P. Heding, L. Linde, B. Ötman, J. Aprotinin reduces insulin resistance caused by excessive degradation in subcutaneous tissue. Diabetologia 19: 279 (1980)

Halban, P.A.: Offord, R.E. The preparation of a semisynthetic tritiated insulin with a specific radioactivity of up to 20 Curies per millimole. Biochem. J. 151: 219-225 (1975)

Halban, P.A.: Berger, M. Offord, R.E. Distribution and metabolism of intravenously injected tritiated insulin in rats. Metab. 28: 1097-1104 (1979)

Hallas-Møller, K.: Petersen, K. Schlichtkrull, J. Crystalline and amorphous insulin-zinc compounds with prolonged action. Ugeskr. Laeg. 113: 1761 (1951)

Harrower, A.D.B.: Duncan, L.J.P. Clarce, B.F. Comparison of injection techniques for soluble and protamine zinc insulins in diabetes mellitus. The Practitioner 214: 228-231 (1975)

Heilmann, K.: Therapeutische Systeme: Konzept und Realisation organspezifischer Arzneiverabreichung. F. Enke Verlag, Stuttgart (1977)

Hohorst, H.J.: L-Lactate. Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: H.U. Bergmeyer (Ed.): Methoden der Enzymatischen Analyse. 1425-1429, Weinheim, W-Germany Verlag Chemie 1970

Howard-Jones, N.: A critical study of the origins and early development of hypodermic medication. J. History Medicine 2: 201-249 (1947)

Hunter, C.: Practical remarks on the hypodermal treatment of disease. Lancet II 44-445, 675-676 (1863)

Hunter, C.: On the speedy relief of pain and other nervous affections by means of the hypodermic method. London (1865)

Hunter, C.: Hypodermic administration of certain medicines. Med. Times Gaz. I 584-587 (1865)

Joiner, C.L.: Rate of clearance of insulin labelled with J^{131} from the subcutaneous tissues. Lancet I: 964-967 (1959)

Joslin, E.P.: Gray, H. Root, H.F. Insulin in hospital and home. J. Metab. Res. 2: 651-699 (1922)

Joslin, E.P.: The treatment of Diabetes mellitus. In: Treatment of Diabetes mellitus, 10. Auflage Hrsg.: Lea und Febinger, Philadel. 243-300 (1939)

Jovanvic, L.: Petersen, C.M. Saxena, B.B. Dawood, Y. Saudek, C.D. Feasibility of maintaining normal glucose profiles in insulin-dependent pregnant diabetic women. Am. J. Medicine 68: 105-112 (1980)

Jörgens, V.: Berchtold, P. Berger, M. Therapie des insulinbedürftigen Diabetes mellitus: regelmässige Stoffwechselselbstkontrolle und Insulin-Dosisadaptation durch den Patienten. Dtsch. Med. Wschr. 104: 1796-1798 (1979)

Kaneko, T.: Oda, H. Munemura, M. Oda, K. Yanashita, S. Suzuk, M. Yanaihara, N. Hashimoto, T. Yanaihara, C. Radioimmunoassay of human proinsulin c-peptide using synthetic human connecting peptide. Endocrinol. Jpn. 21: 141-145 (1974)

Katsch, G.: Die Arbeitstherapie der Zuckerkranken. Ergebn. Phys. Diätet. Therapie I, 1-36 (1939)

Kaufmann, W.: Betz, E. Hundeshagen, H. Marx, H.H. Schlitter, J.G. Stein, E. Schölmerich, P. Kreislaufreaktionen bei rascher Erhöhung der Lufttemperatur. Verh. dtsch. Ges. f. Kreislaufforschung 25: 271-277 (1959)

Kawamori, R.: Vranic, M. Mechanism of exercise induced hypoglycemia in depancreatized dogs maintained on long-acting insulin. J. Clin. Invest. 59: 331-337 (1977)

Kley, H.K.:
Bartmann, E.
Krüskemper, H.L.
A simple and rapid method to measure non-protein-bound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol by equilibrium dialysis: comparison with centrifugal filtration.
Acta Endocr. 85: 209-219 (1977)

Klotz, U.:
Klinische Pharmakokinetik.
Gustav Fischer Verl., Stuttgart-New York, (1979)

Koivisto, V.A.:
Felig, P.
Effects of leg exercise on insulin-absorption in diabetic patients.
New Engl. J. Med. 298: 77-83 (1978)

Koivisto, V.A.:
Felig, P.
Alterations in insulin absorption and in blood glucose control associated with varying insulin injection sites in diabetic patients.
Ann. of Intern. Med. 92: 59-61 (1980)

Koivisto, V.A.:
Sauna-induced acceleration in insulin absorption from subcutaneous injection site.
Brit. Med. J.: I, 1411-1413 (1980)

Kølendorf, K.:
Bojsen, J.
Nielsen, S.L.
Adipose tissue blood flow and insulin disappearance from subcutaneous tissue.
Clin. Pharmacol. Ther. 25: 598-604 (1979)

Lafargue, G.V.:
Lettre de M. le Docteur Lafargue de Saint-Emilion sur l'inoculation de la morphine avec la lancette.
Bull. Acad. Med. Paris I, 40-42 (1836)

Landois-Rosemann:
Lehrbuch der Physiologie des Menschen, Bd. I Hrsg: H.U.Rosemann, 28. Aufl. Verl. Urban-Schwarzenberg München-Berlin (1960)

Lawrence, R.D.: The effect of exercise on insulin action in diabetes. Brit. Med. J. I, 648-652 (1926)

Leiter, J.: Vereinfachte subcutane Injektionsspritze. Wien. med. Wschr. 14: 366-367 (1864)

Lochner, W.: Nassen, M. Untersuchungen über den Herzstoffwechsel und die Coronardurchblutung, insbesondere bei Dinitrophenolvergiftung. Pfluegers Arch. 271, 405-419 (1960)

Love, A.H.G.: Shanks, R.G. The relationship between the onset of sweating and vasodilatation in the forearm during body heating. J. Physiol. 162: 121-128 (1962)

Luft, R.: Insulin: Islet pathology-islet function-insulin treatment. Ed. R. Luft, Verl.: Lindgren und Söner AB, Mölndal, Schweden (1976)

Mehnert, H.: Schöffling, K. Diabetologie in Klinik und Praxis. Ed.: Mehnert-Schöffling Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

Mellanby, J.: Williamson, D.H. Acetacetat. In: H.U. Bergmeyer (Ed.): Methoden der Enzymatischen Analyse. 1776-1779, Weinheim, W.-Germany Verlag Chemie 1970

Medical and chirurgical Society: Report of the scientific committee appointed to investigate the physiological and therapeutic effects of the hypodermic method of injection. Med. Chirurg. Trans. 32: 561 (1867)

Mering, J. von: Minkowski, O. Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 26: 371 (1889/90)

Moore, E.W.:
Mitchel, M.L.
Chalmers, T.C.
Variability in absorption of insulin-^{131} I in normal and diabetic subjects after subcutaneous and intramuscular injection.
J. Clin. Invest. 38, 1222-1227 (1959)

Müller, W.A.:
Taillens, C.
Léreret, S.
Berger, M.
Philippe, J.
Halban, P.A.
Offord, R. E.
Resistance against subcutaneous insulin successfully managed with aprotinin.
Lancet I, 1245-1246 (1980)

Nora, J.J.:
Smith, D.W.
Cameron, J.R.
The route of insulin administration in the management of diabetes mellitus
J. Pediatr. 64: 547-551 (1964)

Nussbaum:
Medical Times + Gazette 2: 337 (1865)

Offord, R.E.:
Philippe, J.
Davies, J.G.
Halban, P.A.
Berger, M.
The inhibition of degradation of insulin by ophthalmic acid and a bovine pancreatic protease inhibitor.
Biochem. J. 182: 249-251 (1979)

Pappenheimer, J.R.:
Passage of molecules through capillary walls.
Physiol. Rev. 33: 387-423 (1953)

Paulsen, E.P.:
Courtney, J.W.
Duckworth, W.C.
Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin.
Diabetes 28: 640-645 (1979)

Poulsen, J.E.:
Deckert, T.
Insulin: Islet pathology, islet function, insulin treatment.
Insulin preparations and the clinical use of insulin.
Ed.: R. Luft 199-212 (1976)

Riegelmann, S.:
Rowland, M.
Effect of route of administration on drug disposition.
J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics I: 419-434 (1973)

Ritschel, W.A.:
Angewandte Biopharmazie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart, (1973)

Ryan, T.J.:
Structure, pattern and shape of the blood vessels of the skin.
In: The physiology and pathophysiology of the skin. Vol. II 577-649
Ed.: by A. Jarrett, Acad. Press, London-New York (1973)

Rynd, F.:
Description of an instrument for the subcutaneous introduction of fluids in affections of nerves.
Dublin Quart, J. Med. Sci. 32: 13, (1861)

Sanger, F.:
Thompson, E.O.P.
The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin.
1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates.
2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates.
Biochem. J. 53, 353 (1953)

Sejrsen, P.:
Blood flow in cutaneous tissue in man studied by washout of radioactive xenon.
Circulat. Res. 25: 215-229 (1967)

Schou, J.:
Absorption of drugs from subcutaneous connective tissue.
Pharmacol. Rev. 13: 441-464 (1961)

Schöffling, K.:
Müller, R.
Die klinische Wirkung der Insulin-Zubereitungen.
In: Insulin, Part 1, Handbook of experimental pharmacology. Dörzbach, E. (Ed.) 321-338, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1971

Schlichtkrull, J.:
Pingel, M.
Heding, L.G.
Brange, J.
Jorgensen, K.H.
Insulin preparations with prolonged effect.
In: Insulin, Part 2, Handbook of experimental pharmacology. Hasselblatt A., Bruchhausen, F. von (Eds.) 729-777. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1975

Stevenson, R.W.:
Tsokak, T.J.
Parsons, J.A.
Matched glucose responses to insulin administered subcutaneously and intravenously. Evidence for subcutaneous inactivation.
Diabetologia, 18: 423-426, (1980)

Stone, P.W.:
Miller, W.B.
Mobilization of radioactive sodium from gastrocnemius muscle of dog.
Proc. Soc, exp. Biol., N.Y. 71: 529-534 (1949)

Tchobroutsky, G.:
Charitanski, D.
Blouquit, Y.
Papoz, L.
Soria, J.
Rosa, J.
Diabetic control in 102 insulin-treated out-patients.
Diabetologia 18: 447-452 (1980)

Teorell, T.:
Kinetics of distribution of substances administered to the body.
Arch. Int. Pharmacodyn. 37: 205-225 (1957)

Trumper, M.:
Thompson, G.J.
Prolonging the effects of penicillin by chilling.
J.A.M.A. 130: 627-630 (1946)

Unger, R.H.:
Aguilar-Parada, E.
Müller, W.A.
Eisentraut, A.M.
Studies of pancreatic alpha-cell function in normal and diabetic subjects.
J. Clin. Invest. 49: 837-848 (1970)

Vranic, M.:
Berger, M.
Exercise and diabetes mellitus.
Diabetes 28: 147-163 (1979)

Wide, L.:
Porath, F.
Radioimmunoassay of proteins with the use of sephadex-coupled antibodies.
Biochem. Biophys. Acta 130, 257 (1966)

Wiegelmann, W.:
Wachstumshormon und Gonadotropine bei Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems.
München: Urban und Schwarzenberg 1973

Williamson, D.H.:
Mellanby, J.
D-3-Hydroxybutyrate.
In: H.U. Bergmeyer (Ed.): Methoden der Enzymatischen Analyse, 1772-1775, Weinheim, W.-Germany: Verlag Chemie 1970

Wood, A.:
Treatment of neuralgia pains by narcotic injections.
Brit. med. J. 221-223 (1858)

Wood, A.:
A new method of treating neuralgia by the direct application of opiates to the painfull points.
Edinb. Med. Surg. Jour. 265-281 (1858)

Zinman, B.:
Murray, F.T.
Vranic, M.
Albisser, A.M.
Leibel, B.S.
McLean, P.A.
Marliss, E.B.
Glucoregulation during moderate exercise in insulin treated diabetics.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45: 641-652 (1977)

F DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann danke ich für das fördernde Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.
Für engagierte Mitarbeit und ausgezeichnete technische Assistenz darf ich mich bei Frau Schütte, Frau Broermann und den Damen der Ernährungsberatung: Frau Gösseringer, Frau Hansen und Frau Schubert sehr herzlich bedanken.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Berger und Herrn Prof. Dr. P. Berchtold für jahrelange Beratung, Freundschaft und kritische Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Arbeiten.

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791